



**NUNO RICARDO  
GONÇALVES DA  
SILVA**

**UTILIDADE CLÍNICA DA QUANTIFICAÇÃO DO  
ANTIGÉNIO DO CORE DO VHC**



**NUNO RICARDO  
GONÇALVES DA  
SILVA**

**UTILIDADE CLÍNICA DA QUANTIFICAÇÃO DO  
ANTIGÉNIO DO CORE DO VHC**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Dr. José Rafael Fernández Menéndez, Médico Especialista em Imunohemoterapia do Serviço de Sangue e Medicina Transfusional dos Hospitais da Universidade de Coimbra – E.P.E. e coorientação da Professora Doutora Adelaide Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mulher Andreia pelo apoio, dedicação e paciência e à minha filha Mariana, pela compreensão da ausência do Pai nos momentos finais deste trabalho.

## **o júri**

### **Presidente**

**Doutora Gabriela Moura**

Investigadora Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM),  
Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

**Dr. José Rafael Fernández Menéndez (orientador)**

Médico Especialista em Imunohemoterapia, responsável pelo Laboratório de Serologia Viral e Biologia Molecular de Dadores de Sangue do Serviço de Sangue e Medicina Transfusional dos Hospitais da Universidade de Coimbra – E.P.E.

**Professora Doutora Adelaide Almeida (coorientador)**

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Dr. Jorge Humberto Moura Pinto Tomaz (arguente)**

Diretor do Serviço de Sangue e Medicina Transfusional dos Hospitais da Universidade de Coimbra – E.P.E., Médico Especialista em Imunohemoterapia do Serviço de Sangue e Medicina Transfusional dos Hospitais da Universidade de Coimbra – E.P.E., Mestre pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

## **agradecimentos**

Agradeço ao Dr. José Rafael Menéndez e à Professora Doutora Adelaide Almeida a orientação científica deste estudo.

Um agradecimento especial à Doutora Margarida Pocinho pela oportunidade que me deu na obtenção de novos conhecimentos e pela ajuda fundamental prestada, imprescindíveis para a realização deste estudo.

Agradeço ao Diretor do Serviço de Sangue e Medicina Transfusional dos Hospitais da Universidade de Coimbra – E.P.E., Dr. Jorge Tomaz pela oportunidade, apoio e incentivo dados para a realização deste trabalho.

Agradeço à ex-Diretora do Serviço de Sangue e Medicina Transfusional dos Hospitais da Universidade de Coimbra – E.P.E., Dra. Paula Seíça Neto pela oportunidade e apoio para a realização deste trabalho.

Um agradecimento especial à Professora Doutora Fátima Martins do Laboratório de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra – E.P.E., pela ajuda imprescindível na obtenção da autorização legal para a execução deste estudo.

Um agradecimento especial ao Dr. José Rafael Menéndez pelo apoio, pela disponibilidade constante, incentivo, todo o saber e sobretudo pela amizade estabelecida.

Um agradecimento especial à Abbott Diagnostics®, em particular à Dra. Isabel Sofia pela disponibilidade, ajuda e apoio logístico.

Agradeço à Dra. Celene Sargento, Técnica Ana Margarida, Técnica Emília Silva e Técnica Célia Ferreira, do Serviço de Sangue e Medicina Transfusional dos Hospitais da Universidade de Coimbra – E.P.E. pela ajuda e apoio dados relativamente ao laboratório de Biologia Molecular de doentes do mesmo Serviço.

Aos meus Pais, Isidro e Isabel, ao meu irmão, Mestre Pedro Silva, à minha querida avó Idalina, aos meus sogros e a toda a minha família e amigos agradeço o amor, a força, a compreensão e o apoio na execução deste trabalho.

À minha mulher Andreia e à minha filhota Mariana, um agradecimento especial pela paciência e apoio que tiveram comigo ao longo desta longa caminhada.

Agradeço à Universidade de Aveiro, em particular ao Departamento de Biologia que me proporcionaram todas as condições para desenvolver o meu trabalho.

## palavras-chave

VHC, PCR-RT, HCV Ag *core*, Quimioluminescência.

## resumo

A infeção pelo VHC nos últimos anos tem vindo a revelar-se um problema de saúde pública à escala mundial. De facto, apesar dos enormes avanços quer no diagnóstico, quer no tratamento de doentes infetados por este vírus, estima-se que cerca de 3% da população mundial, correspondendo a 170 milhões de indivíduos, esteja infetada pelo VHC permanecendo uma grande parte assintomática por vários anos, tornando-se assim, num problema de saúde à escala global.

A tentativa laboratorial de reduzir cada vez mais o período de janela no diagnóstico laboratorial da infeção pelo VHC fez com que surgissem no mercado testes de diagnóstico de infeção viral ativa, com uma cinética e correlação excelente com a carga viral do vírus. O período de janela da pesquisa de anticorpos para o VHC é de cerca de 45 a 60 dias, enquanto que para os testes de quantificação do antígeno do *core* do vírus é apenas de 14 dias, mais 2 dias que na pesquisa do RNA viral.

O objetivo principal deste trabalho consistiu na avaliação da utilidade clínica do teste de quantificação do antígeno do *core* do VHC da Abbott Diagnostics®. Para tal, foram analisadas com este teste 105 amostras de doentes dos Hospitais da Universidade de Coimbra-E.P.E. a fazer tratamento para a infeção pelo vírus, e os resultados foram comparados com os resultados obtidos pelo método de PCR em tempo real pelo teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV da Roche®. A análise estatística mostrou uma correlação significativa entre os dois testes ( $p=0,97$  para um  $p < 0,001$ ). Verificou-se também que o teste HCV Ag *core* deixa de ser sensível em doentes com carga viral menor ou igual a 2500 UI/ml.

Foi possível concluir que o teste de quantificação do antígeno do *core* do VHC estudado poderá ser utilizado para monitorizar doentes em terapia para a infeção pelo VHC apenas enquanto a carga viral se mantiver acima de 2500 UI/ml. O Teste HCV Ag *core* poderá ser utilizado como teste complementar no diagnóstico de infeção pelo VHC em doentes hemodialisados, vítimas de acidentes de trabalho de profissionais de saúde e candidatos a transplante hepático.

**keywords**

HCV, PCR-RT, HCV Ag core, Chemiluminescence.

**abstract**

In recent years, HCV infection has been proved to be a public health problem worldwide. In fact, despite huge advances in either diagnosis or treatment of patients infected by this virus, it is estimated that about 3% of the global population, representing 170 million individuals, may be infected with HCV and many of them remain asymptomatic for several years, thus becoming a global health issue.

The attempt in reducing the window period in the laboratorial diagnosis of HCV infection has spurred new diagnostic tests for active viral infection, with excellent kinetics and correlation with viral load. The window period of antibody to HCV is about 45 to 60 days, while for the quantification of the Antigen core of the virus, this period is reduced to 14 days, 2 days more than the search of viral RNA.

The aim of this study was to assess the clinical usefulness of the quantification HCV Ag core test by Abbott® Diagnostics®. The methodology used was the comparison of the results of this test with the results of the real time PCR Cobas® Ampliprep / Cobas® TaqMan® HCV test of Roche®. In this study was used a group of 105 samples from patients of the Hospitais da Universidade de Coimbra – E.P.E. receiving treatment for HCV infection. The statistical analysis showed a significant correlation between the two methods ( $p=0,97$  for a  $p < 0,001$ ). It was observed that the HCV Ag core test loses sensitivity in patients whose viral load is under or equal to 2500 UI/ml.

In conclusion, the quantification of HCV Ag core test studied can be used to monitor patients going on therapy for HCV infection only when the viral load remains above 2500 UI/ml. This Test may be also used as a complementary test for the diagnosis of HCV infection in hemodialysis patients, victims of health labor accidents and liver transplant candidates.

## Índice Geral

<b>Capítulo I.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Hepatite C.....</b>	<b>2</b>
1.1. Enquadramento histórico.....	2
1.2. Incidência da hepatite C.....	3
<b>2. O Vírus da Hepatite C.....</b>	<b>5</b>
2.1. Filogenia do VHC.....	5
2.2. Genoma viral.....	5
2.2.1. Região não codificante.....	6
2.2.2. Proteínas estruturais.....	7
2.2.3. Proteínas não estruturais.....	8
2.2.4. Genótipos.....	9
2.2.5. Quasiespécies.....	10
2.3. Replicação viral.....	11
2.3.1. Entrada na célula.....	11
2.3.2. Tradução e processamento da poliproteína.....	12
2.3.3. Replicação do vírus.....	12
<b>3. Transmissão do VHC.....</b>	<b>12</b>
3.1. Vias de transmissão.....	12
3.2. Evolução natural do vírus.....	13
<b>4. Diagnóstico laboratorial do VHC.....</b>	<b>14</b>
4.1. Ensaio imunoenzimático (E.L.I.S.A.) .....	15
4.2. Quimioluminescência (C.L.I.A.) .....	15



4.3. Testes de Biologia Molecular.....	16
4.3.1. Genótipo.....	16
4.3.2. Carga viral.....	16
4.4. Parâmetros bioquímicos.....	17
<b>5. Terapêutica.....</b>	<b>18</b>
5.1. Interferon peguilado e Ribavirina.....	19
5.2. Perspetivas futuras.....	20
5.2.1. Inibidores da entrada do vírus na célula do hospedeiro.....	20
5.2.2. Inibidores da replicação viral.....	21
5.2.3. Outros inibidores em estudo.....	21
5.2.4. Vacina.....	22
<b><i>Capítulo II.....</i></b>	<b>23</b>
<b>1. Objetivos.....</b>	<b>24</b>
<b><i>Capítulo III.....</i></b>	<b>26</b>
<b>1. Materiais e métodos.....</b>	<b>27</b>
1.1. População em estudo.....	27
1.2. Obtenção das amostras.....	28
1.3. Metodologia laboratorial.....	28
1.3.1. PCR-RT.....	29
1.3.2. Genótipagem.....	32
1.3.2.1. Extração de RNA.....	32
1.3.2.2. PCR.....	33

1.3.2.3. Genótipagem por hibridização reversa.....	34
1.3.3. Quimioluminescência.....	36
1.4. Tratamento estatístico.....	38
<b>Capítulo IV.....</b>	<b>39</b>
<b>1. Resultados.....</b>	<b>40</b>
<b>2. Discussão.....</b>	<b>61</b>
<b>Capítulo V.....</b>	<b>65</b>
<b>1. Conclusão e perspectivas futuras.....</b>	<b>66</b>
<b>Capítulo VI.....</b>	<b>67</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>68</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 - Prevalência da Hepatite C na Europa e Canadá (Liver International 2011) .....	5
Figura 2 - Genoma do vírus da Hepatite C (www.nature.com).....	6
Figura 3 - Árvore Filogenética do vírus da Hepatite C (www.daveproject.org) .....	10
Figura 4 - Entrada na célula do hospedeiro e replicação do vírus da Hepatite C (www.tibotec.com) .....	11
Figura 5 - História natural do VHC (adaptado de www.Hepatologytextbook.com).....	13
Figura 6 - Período de janela do VHC para os vários marcadores virais; RNA, HCV Ag <i>core</i> , HCV Combo e HCV Ac (www.abbott.com).....	14
Figura 7 - Esquema da curva típica da PCR em tempo real (www. media.wiley.com) .....	17
Figura 8 - Esquema da população estudada.....	27
Figura 9 - Esquema da PCR em Tempo Real (www.foodsafetywatch.com) .....	30
Figura 10 - Princípio do método baseado na hibridização reversa (www.papillpmavirus.cz) .....	34
Figura 11 – Cartão de leitura do ensaio HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA) (www.siemens.com) .....	36
Figura 12 - Pré-tratamento das amostras na quantificação do HCV Ag <i>core</i> .....	37
Figura 13 - Incubação da amostra pré-tratada com as micropartículas magnéticas .....	37
Figura 14 - Adição do conjugado e soluções reveladores de fluorescência na técnica de quimioluminescência .....	37
Figura 15 - Distribuição dos doentes do estudo por sexo.....	40
Figura 16 - Distribuição das amostras por faixa etária.....	40
Figura 17 - Interválo etário dos doentes estudados .....	41
Figura 18 - Percentagem dos genótipos presentes nos 41 doentes .....	41
Figura 19 - Percentagem dos genótipos presentes nas amostras concordantes .....	43
Figura 20 - Percentagem dos genótipos presentes nas amostras discrepantes .....	44
Figura 21 - Resultados do grupo controlo .....	45
Figura 22 - Correlação de Spearman de todos os resultados da PCR-RT com os do HCV Ag <i>core</i> . $p=0,971$ , $p<0,001$ , $n=95$ .....	45

Figura 23 - Correlação de Spearman das amostras nº 1 da PCR-RT com HCV Ag <i>core</i> . $\rho=0,977$ , $p<0,001$ , $n=41$ .....	46
Figura 24 - Correlação das amostras nº 1 da PCR-RT com HCV Ag <i>core</i> .....	46
Figura 25 - Correlação de Spearman das amostras nº 2 da PCR-RT com HCV Ag <i>core</i> . $\rho=0,909$ , $p<0,001$ , $n=41$ .....	47
Figura 26 - Correlação das amostras nº 2 da PCR-RT com HCV Ag <i>core</i> .....	47
Figura 27 - Correlação de Spearman das amostras nº 3 da PCR-RT com HCV Ag <i>core</i> . $\rho=0,922$ , $p<0,001$ , $n=13$ .....	48
Figura 28 - Correlação das amostras nº 3 da PCR-RT com HCV Ag <i>core</i> .....	48
Figura 29 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> no doente 1. .....	49
Figura 30 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 2. .....	49
Figura 31 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> no doente 3. .....	49
Figura 32 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> no doente 4. .....	50
Figura 33 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> no doente 5. .....	50
Figura 34 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 6. .....	50
Figura 35 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 7. .....	50
Figura 36 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 8. .....	51
Figura 37 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 9. .....	51
Figura 38 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 10 .....	51
Figura 39 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 11 .....	51

Figura 40 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 12	52
Figura 41 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 13	52
Figura 42 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 14	52
Figura 43 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 15	52
Figura 44 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 16	53
Figura 45 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 17	53
Figura 46 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 18	53
Figura 47 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 19	53
Figura 48 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 20	54
Figura 49 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 21	54
Figura 50 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 22	54
Figura 51 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 23	54
Figura 52 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 24	55
Figura 53 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 25	55
Figura 54 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 26	55

Figura 55 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 27	55
Figura 56 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 28	56
Figura 57 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 29	56
Figura 58 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 30	56
Figura 59 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 31	56
Figura 60 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 32	57
Figura 61 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 33	57
Figura 62 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 34	57
Figura 63 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 35	57
Figura 64 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 36	58
Figura 65 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 37	58
Figura 66 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 38	58
Figura 67 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 39	58
Figura 68 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 40	59
Figura 69 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag <i>core</i> do doente 41	59

Figura 70 - Genótipo 1a referente aos doentes nº 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 15, 16, 20, 25, 26, 28, 31, 32, 34, 35, 37 e 41 .....	59
Figura 71 - Genótipo 1b referente aos doentes nº 6, 12, 18, 19, 27 e 40.....	59
Figura 72 - Genótipo 3a referente aos doentes nº 4, 11, 13, 14, 17, 21, 23, 24, 29, 30, 33, 36, 38 e 39 .....	59
Figura 73 - Genótipo 4c/4d referente aos doentes nº 8 e 22.....	60

## **Índice de Tabelas**

Tabela I - Recomendação Mundial para o tratamento da Hepatite C.....	20
Tabela II - Protocolo de amplificação pós extração do RNA do VHC .....	34
Tabela III - Teste de diagnóstico PCR-RT/HCV Ag <i>core</i> .....	42
Tabela IV - Relação das amostras concordantes com a carga viral.....	43
Tabela V - Relação das amostras discrepantes com a carga viral .....	44



### Índice de Siglas e Abreviaturas

aa	-	aminoácido
AASLD	-	“American Association for the Study of the Liver Disease”
Ac	-	Anticorpo
Ag	-	Antígeno
ALT	-	Alanina aminotransferase
bDNA	-	“Branched DNA”
C.L.I.A.	-	“Chemiluminescent Immuno Assay”
CDC	-	“Center for Disease Control”
DNA	-	Ácido desóxirribonucleico
DNAc	-	Ácido desóxirribonucleico complementar
E.L.I.S.A.	-	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
HVR – 1	-	Região hipervariável 1
ICTV	-	“International Committee on Virus Taxonomy”
INF $\alpha$	-	Interferon $\alpha$
INF $\alpha$ 2a	-	Interferon $\alpha$ 2a
INF $\alpha$ 2b	-	Interferon $\alpha$ 2b
IRES	-	“Internal Ribosome Entry Site”
Kb	-	kilo base
Kda	-	Kilo Dalton
MgCl <sub>2</sub>	-	Cloreto de Magnésio
miRNA	-	Micro RNA
Mn <sup>2+</sup>	-	Mangânês
NANB	-	não A e não B
NTR	-	“Non translated region”
ORF	-	“Open reading frame”
PCR-RT	-	“Real Time Polymerase Chain Reaction”
PEG	-	Polietilenoglicol
PKR	-	“Protein Kinase RNA”
PKRD	-	“Protein Kinase RNA Dependent”

RIBA	-	“Recombinant Immunoblotting Assay”
RLU	-	“Relative Light Unit”
RNA	-	Ácido ribonucleico
RNAc	-	Ácido ribonucleico complementar
RNAm	-	Ácido ribonucleico mensageiro
RPRD	-	RNA polimerase RNA dependente
RT-PCR	-	Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction
RVM	-	Resposta virológica mantida
SR-B1	-	Recetor Scavenger B tipo 1
TMA	-	“Transcription Mediated Assay”
UI	-	Unidades Internacionais
VHA	-	Vírus da hepatite A
VHB	-	Vírus da hepatite B
VHC	-	Vírus da hepatite C
VHD	-	Vírus da hepatite D
VHE	-	Vírus da hepatite E
VHG	-	Vírus da hepatite G
VIH	-	Vírus da Imunodeficiência Humana
VLDL	-	“Very Low Density Lipoprotein”
WHO	-	Organização Mundial de Saúde

## ***Capítulo I***

Hepatite C

O vírus da Hepatite C

Transmissão do VHC

Diagnóstico laboratorial do VHC

Terapêutica

## 1. HEPATITE C

### 1.1. Enquadramento histórico

As Hepatites causadas pelos vírus apresentam grande importância devido à sua distribuição mundial, atingindo proporções de pandemia. Estes vírus apresentam uma característica em comum, o tropismo pelos hepatócitos. Porém são vírus com características biológicas diversas que foram sendo descobertos ao longo do tempo, recebendo denominação com letras do alfabeto romano – a saber: vírus da Hepatite A (VHA), vírus da Hepatite B (VHB), vírus da Hepatite C (VHC), vírus da hepatite D (VHD), vírus da hepatite E (VHE) e vírus da Hepatite G (VHG) (1). A Hepatite C vem sendo estudada há algumas décadas, mesmo antes da descoberta do agente responsável pela doença, o VHC. Em 1970, testes de triagem serológica para a investigação do VHA e VHB (2), revelaram que, 25% dos casos de hepatite associados à transfusão sanguínea estavam relacionados com o VHB. Os restantes 75%, foram considerados como hepatite não-A não-B (NANB) (1, 3-6).

Os sintomas da infeção aguda ocasionados pelo vírus da hepatite NANB de origem pós-transfusional, nem sempre estavam presentes após episódios de transfusão. Este facto contribuiu para que fossem pouco compreendidas estas doenças, pois não havia o conhecimento necessário em biologia molecular para o aprofundamento da investigação laboratorial. Somente após observação de alguns casos de hepatite NANB que evoluíam com níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT) (7) e progressão para cirrose, é que surgiu um maior interesse em estudar um possível responsável dessa “nova doença” (1, 8).

É então identificado em 1989 pela equipa de investigadores dos laboratórios Chiron conjuntamente com a equipa do “*Center for Disease Control*” (CDC), o vírus responsável pela hepatite C (9-11). O VHC foi então identificado e caracterizado pela equipa do Dr. Qui-Lin Choo (Qui-Lin Choo, George Kuo e Michael Houghton) que na tentativa de identificar o genoma dos vírus responsáveis pelas hepatites NANB, consegue clonar a partir de ácido desóxirribonucleico complementar (DNAC), obtido de plasma de chimpanzé infectado com soro de um doente com hepatite NANB, uma parte do genoma do VHC (2, 12-13). O estudo de um destes clones possibilitou a identificação de um pequeno vírus com

envelope lipídico (6) que viria a ser denominado vírus da hepatite C. Foi com base neste estudo que, foram desenvolvidos os primeiros testes laboratoriais para a pesquisa deste vírus (14).

Do universo das hepatites, as hepatites A, B e C são de facto as mais frequentes em todo o mundo. O VHA, vírus de ácido ribonucleico (RNA) (15) pertencente à família *Picornaviridae* foi identificado em 1973 (6) apresentando uma incidência de 1,4 milhões de novos casos por ano, sendo que, em países industrializados o ratio é de 1.5/100000 por ano enquanto em países subdesenvolvidos, o ratio é de 150/100000 (6). O VHB é um vírus de ácido desóxirribonucleico (DNA) pertencente à família *Hepadnavirus*. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), estima-se que 2 biliões de indivíduos em todo o mundo já tiveram contacto com o vírus e que aproximadamente 350 milhões de pessoas são portadores crónicos do VHB (6).

### 1.2. Incidência da hepatite C

A infeção por VHC tem vindo nos últimos anos a requerer uma especial atenção por parte dos organismos de saúde mundial. É de facto um problema de saúde pública (16-18) pois apesar do enorme avanço nos meios de diagnóstico e tratamento (19), o número de infeções continua a aumentar, prevendo-se ainda que durante a próxima década, estes números continuem a subir, pois para além do facto de que existem ainda muitos casos por diagnosticar (15), muitos dos doentes permanecem assintomáticos durante décadas (16). De acordo com a WHO estima-se que, cerca de 3% da população mundial esteja infetado pelo VHC (6, 13, 16, 18, 20-22) correspondendo a aproximadamente 170 milhões de pessoas (3-4, 6, 13, 21-28), surgindo entre três a quatro milhões de novos casos por ano (4, 17-18). Dos doentes infetados, entre 15 a 30% consegue curar a doença, nos restantes, a doença evolui para a cronicidade (6, 28-29) sendo que, 20% destes pacientes ao fim de 20 anos, desenvolvem cirrose hepática (6, 18, 20). Cofactores como o álcool, a coinfeção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e outras doenças hepáticas, aceleram este processo (18, 26). Destes, 1 a 4% evoluem para carcinoma hepatocelular (26, 30), sendo por isso, o VHC responsável em dois terços pelo número de transplantes hepáticos no

mundo (6, 21, 27) e o 1º responsável pelo número de transplantes hepáticos nos países industrializados (21).

Os sintomas da infeção por VHC são geralmente “ignorados” pois assemelham-se e podem ser confundidos como pertencentes a outras doenças. No entanto, os sintomas da infeção por VHC podem ser distinguidos entre sintomas de fase aguda e sintomas de fase crónica. Assim, na fase aguda da doença, poderá surgir um mal-estar geral, náuseas e dor no quadrante superior direito (6). Quando a doença atinge a fase crónica, os sintomas mais frequentes são a fadiga, náuseas, fraqueza geral, mialgias, perda de peso, dor nas articulações, crioglobulinémia, doenças autoimunes e doenças renais (6).

De um modo geral, Austrália, Canadá e o norte da Europa apresentam as menores taxas de prevalência da hepatite C (<1%) (15) enquanto o resto da Europa apresenta uma prevalência que varia de 1 a 3%, (15, 20) (Figura 1). Estima-se que em toda a Europa cerca de 11,3 a 14,7 milhões de indivíduos estejam infetados com o VHC, sendo o sexo masculino mais afetado, predominando o genótipo 1a seguido do 3a (15, 17, 20).

Em Portugal, apesar de só existir um dado oficial publicado sobre esta doença (15), a taxa de incidência de hepatite C varia entre 1 e 1,9%, correspondendo a aproximadamente 150 mil portugueses infetados cronicamente (31-33). Outro dado importante é também o sexo masculino ser o mais afetado, com um ratio de 4:1, predominando também o genótipo 1a seguido do 3a (15).

É referenciado que o genótipo 1 está mais associado à transmissão por transfusão de sangue e seus derivados enquanto o genótipo 3 está associado a pessoas jovens com comportamentos de risco, especialmente consumidores de drogas de abuso (15, 20). As taxas mais elevadas de infeção pelo VHC são encontradas em muitos dos países do continente Africano, América Latina, Ásia Central e Sudoeste Asiático.

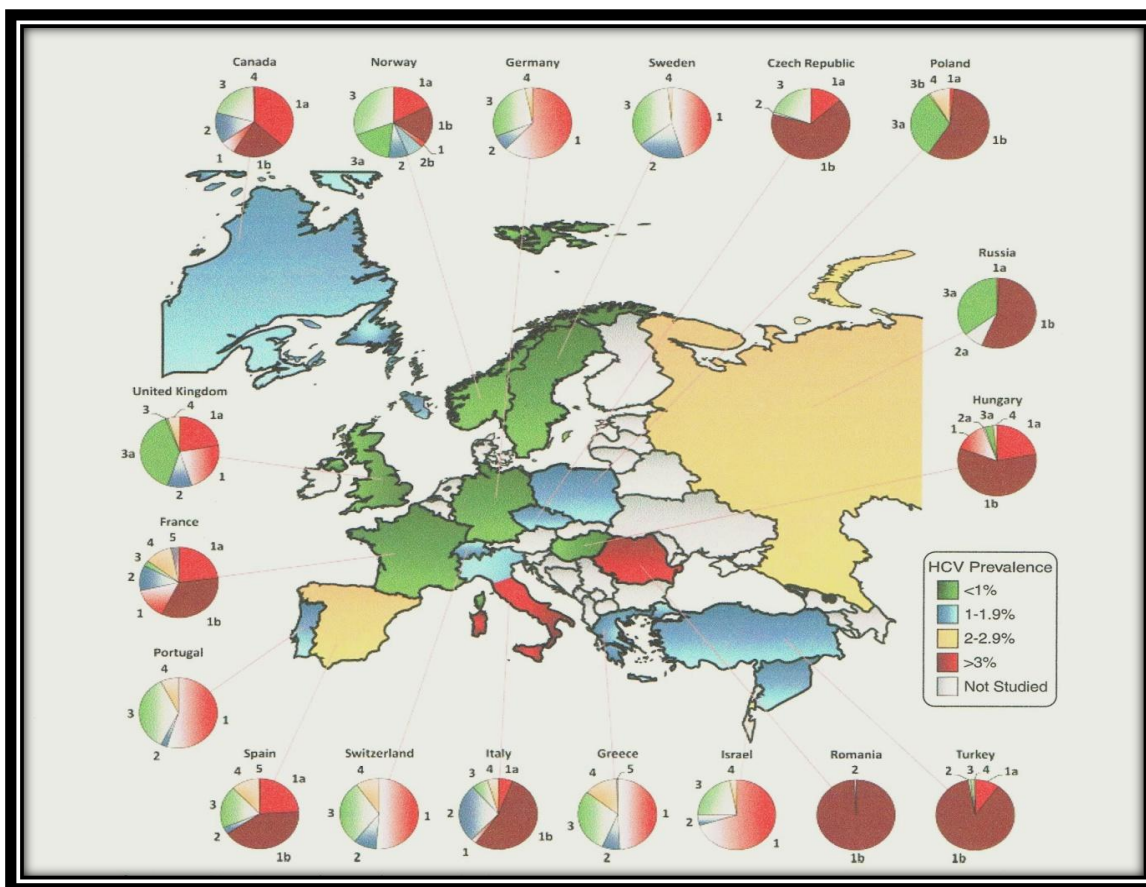


Figura 1 - Prevalência da Hepatite C na Europa e Canadá (Liver International 2011)

## 2. O vírus da Hepatite C

### 2.1. Filogenia do VHC

A morfologia do VHC mostra grandes semelhanças com os *Flavivirus* e os *Pestivirus* mas por recomendação do *International Committee on Virus Taxonomy* (ICVT), o VHC foi englobado na família *Flaviviridae* (3, 9, 18, 21, 30, 34-36), inserindo-se no género *Hepacivirus* devido à sua estrutura complexa (3, 6, 24, 27, 36).

### 2.2. Genoma viral

O vírus da hepatite C é um vírus de RNA (15, 37) com invólucro bi-lipídico (10) que encerra no seu interior uma cadeia única de sentido positivo (6, 10, 30, 36) com cerca de 55-65 nm e aproximadamente 9.6 kb (6, 9-10, 24-26). Esta cadeia de RNA compreende

uma zona codificante denominada de *Open Reading Frame* (ORF) (6, 29, 35, 38-39) que é delimitada por duas extremidades, as regiões 5' e 3' respetivamente (26). São regiões altamente conservadas que embora não sendo codificantes (NTR), apresentam elementos de controlo para a tradução e replicação viral (6, 40). A zona codificante do vírus é precursora de uma poliproteína com cerca de 3000 aminoácidos (aa) (6, 36), que após clivagem por ação de enzimas virais e celulares, origina 3 proteínas estruturais (*core*, E1, E2) e 7 proteínas não estruturais (P7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b) (3, 9, 23-26, 30, 36) (Figura 2).

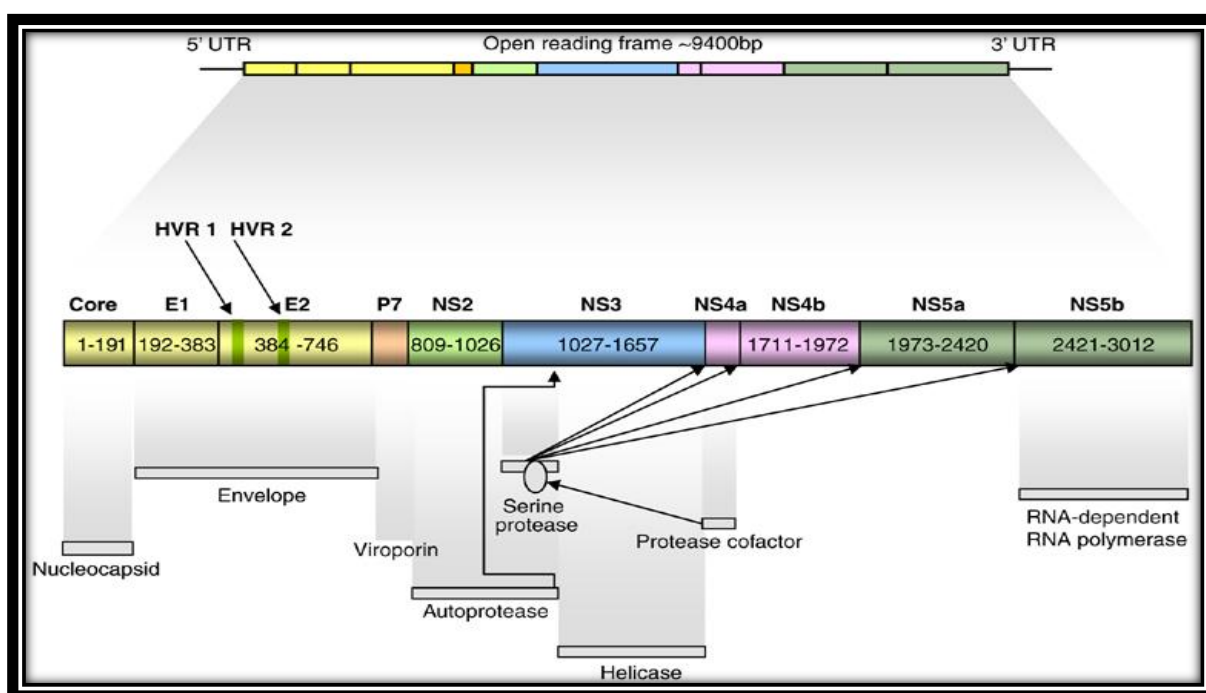


Figura 2 - Genoma do vírus da Hepatite C ([www.nature.com](http://www.nature.com))

### 2.1.1. Região não codificante

A região não codificante do VHC contém apenas elementos que controlam a tradução e a replicação viral. A extremidade 5' tem aproximadamente 341 nucleótidos e contém o local de entrada ribossomal *Internal Ribosome Entry Site* (IRES) (6, 36), local a que se liga a sub-região 40S do ribossoma, que é requerido para a mediação da tradução do RNA viral para a poliproteína (3).



A região 3' tem cerca de 200 nucleótidos e está diretamente implicada na replicação do vírus. Podem aqui ser encontrados 3 domínios diferentes: o primeiro tem cerca de 80 nucleótidos cuja função não é ainda bem conhecida; o segundo domínio com 30 nucleótidos, parece exercer ação sobre a região NS3 e o terceiro domínio, com cerca de 98 nucleótidos, parece ter implicação direta na replicação viral, nomeadamente por interagir com a RNA polimerase (23).

### **2.1.2. Proteínas estruturais**

As proteínas *core*, E1 e E2 são libertadas do retículo endoplasmático por ação de peptidases, durante o processo replicativo do vírus (36).

A proteína *core* localizada no início da região 5' da poliproteína, corresponde aos primeiros 191 aa desta (6, 41). É um péptido multifuncional altamente conservado e antigénico (8) que se divide em 3 subdomínios. É responsável pela formação do invólucro nuclear do vírus (3, 6, 34) tendo também, implicação na oncogenese hepatocelular. Exerce um papel importante na indução da resposta celular e humoral (8, 34-35), diminuindo a produção de interferon pelos genes antivirais das células do hospedeiro e também no metabolismo dos lípidos, pois ao fazer uso dos mesmos na replicação viral, contribui para a esteatose hepática (10, 17, 24).

As proteínas E1 e E2 são glicoproteínas precursoras do invólucro lipídico do vírus e ambas são requeridas no processo de entrada do vírus na célula do hospedeiro (3). A proteína E1 tem 192 aa enquanto a proteína E2 tem 363 aa. No terminal amínico da E2 foi identificado um domínio hipervariável 1 (HVR-1) que funciona como local de ligação de anticorpos (6, 24), fazendo deste, um dos locais mais importantes do genoma viral e da terapia retroviral (6, 40). O mesmo ao sofrer mutação, leva a que o organismo infetado deixe de ter ligação para os anticorpos que foram criados para eliminar o vírus escapando assim ao sistema imunitário do hospedeiro (17-18). Além da função estrutural foi demonstrado que a E2 interage com a *Protein Kinase RNA Dependent* (PKRD) que é induzida pelo interferon, sendo este, um possível mecanismo de inibição da atividade antiviral.

### **2.1.3. Proteínas não estruturais**

A proteína p7 pertence a uma família de proteínas conhecidas como viroporinas que têm a capacidade de formar canais iónicos de cálcio em membranas lipídicas (3, 6, 17, 30, 36, 42). É uma proteína hidrofóbica, com 63 aa com possibilidade de formar complexos precursores com a proteína estrutural E2 e não estrutural NS2, complexos que se creem ter um papel importante na regulação do ciclo do vírus. O canal iónico formado por esta proteína tem um papel determinante na produção de partículas virais durante o ciclo replicativo, o que torna esta proteína uma série candidata a alvo da terapia retroviral (36).

A proteína NS2 é um péptido hidrofóbico e transmembranar com 217 aa. A atividade proteolítica desta só é possível na presença de zinco e é aplicada na clivagem da ligação NS2/NS3 (6, 17, 30). A NS2 interage com todas as outras proteínas não estruturais, tendo sido demonstrado que, interage também consigo mesma, formando homo-dímeros.

A proteína NS3, com 631aa, é uma proteína trifuncional pertencente à super família das helicases 2 DExH/D-box, podendo exercer funções como protease serínica, RNA helicase e NTPase (3, 6, 9, 17, 30). Juntamente com o seu cofactor NS4a, é responsável pela clivagem nas ligações NS3/4a, NS4a/4b, NS4b/NS5a e NS5a/NS5b (6, 17).

A proteína NS4a, também conhecida como cofactor da proteína NS3 (6, 17) tem 54 aa. O terminal amínico da NS4a é responsável pela associação da NS3-NS4a assim como, pela associação a outras proteínas no retículo endoplasmático, onde se processa a replicação viral.

A proteína NS4b é um péptido altamente hidrofóbico com 217 aa. Recentemente foi demonstrado que esta proteína induz alteração membranar denominada de rede membranar, sendo esta rede formada essencialmente por vesículas (80-180 nm) associadas ao retículo endoplasmático rugoso. Esta rede é essencial ao complexo de replicação viral (6, 17, 30).

A proteína não estrutural 5a (NS5a), com 458 aa, pode apresentar-se na forma fosforilada (56 kDa) ou na forma hiperfosforilada (58 pKDa). A perda desta hiperfosforilação estimula a replicação do RNA viral. Esta proteína também tem a capacidade de inibir a produção de interferon-gama (INF- $\gamma$ ) por interação com uma porção da proteína cinase de RNA (PKR) (6, 17), o que a torna um importante alvo da terapia (30).

A NS5b é uma RNA polimerase RNA dependente (RpRD) (6, 9, 17, 30) com 591 aa, capaz de transcrever *in vitro* todo o genoma do vírus, não tendo, no entanto, a função de *proofreading*, sendo por isso, responsável pelo aparecimento de erros durante o processo replicativo (3, 6, 17). Esta proteína inicia a síntese da cadeia complementar negativa de RNA gerando assim, uma cópia da cadeia positiva do vírus (4). O VHC mantém porém, uma parte do seu genoma conservado não sofrendo qualquer alteração, o que faz com que este balanço entre o “errado” e o altamente “conservado” evite a catástrofe replicativa viral (3).

### 2.1.4. Genótipos

O estudo e determinação dos genótipos e subgrupos em indivíduos infetados pelo VHC que vão iniciar tratamento, é extremamente importante, pois o tratamento proposto é feito de acordo com o tipo de genótipo presente no indivíduo infetado (33, 43).

A análise das sequências nucleotídicas do vírus da hepatite C demonstra uma divergência genética substancial de cerca de 30% (6, 26, 30, 33) permitindo classificar as várias estirpes do vírus em genótipos. O VHC pode ser dividido em seis genótipos *major*, 1 a 6, (3, 6, 21, 26-27, 30, 33, 36, 44) e estes ainda se dividem em cerca de 80 subgrupos, com uma semelhança genética de cerca de 80 a 90% (9, 26). A distribuição geográfica dos vários genótipos é bastante variável (Figura 3). Os genótipos 1, 2 e 3 encontram-se distribuídos de uma maneira geral por todo o mundo. Na Europa predomina o genótipo 1 (17), na Índia, Nepal e Paquistão o genótipo 3 (17) enquanto o genótipo 4 é mais frequente no Médio Oriente e África (21), sendo o 5 na África do Sul e o 6 no continente Asiático (6, 30).

Em Portugal predomina o genótipo 1 seguido do genótipo 3.

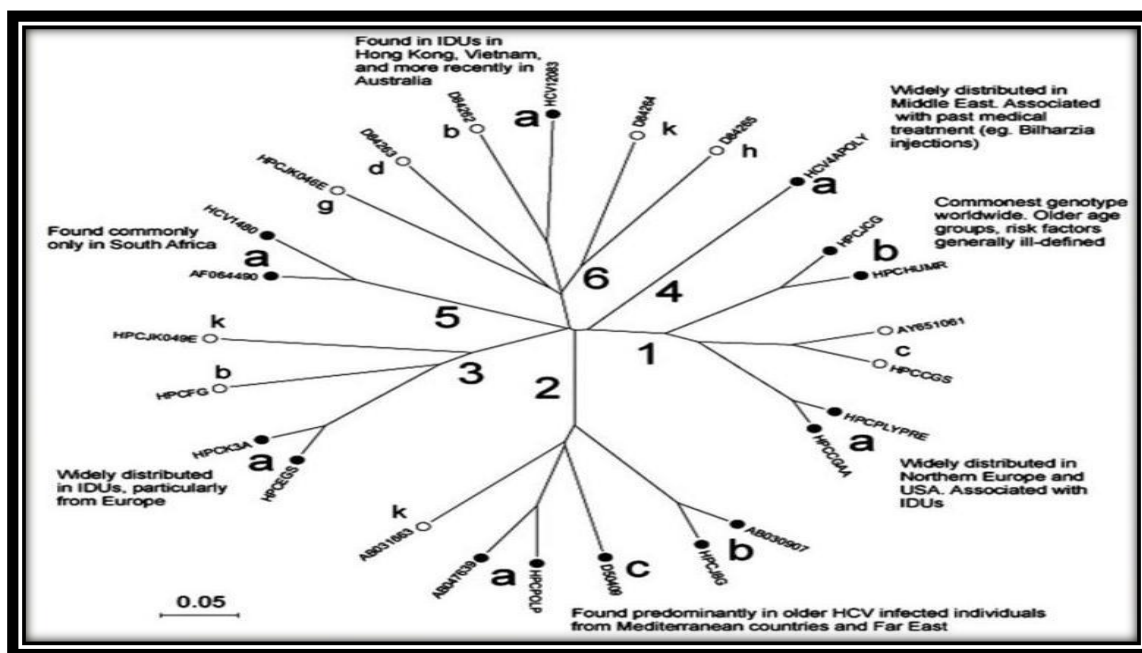


Figura 3 - Árvore Filogenética do vírus da Hepatite C ([www.daveproject.org](http://www.daveproject.org))

### 2.1.5. Quasiespécies

O vírus da hepatite C tem a capacidade de sofrer alterações dentro do mesmo organismo ao longo do tempo. Este mecanismo resulta na formação das chamadas “quasiespécies”, isto é, uma população de variantes virais distintas mas relacionadas entre si (45). Grande parte desta variação genética, é devida à ocorrência de uma elevada taxa de mutações resultantes da ausência de atividade de *proofreading* da proteína NS5b (3, 6, 9, 17-18, 29) assim como à elevada taxa de replicação do vírus (6). Muitas das mutações ocorridas no processo de replicação do vírus, nomeadamente as substituições nucleotídicas, são acumuladas em locais que não alteram a sequência codificante das proteínas do mesmo. A heterogeneidade das quasiespécies pode ser avaliada quantitativamente, designando-se por complexidade viral, e qualitativamente, tendo a designação de diversidade viral (45). Este processo é importante na história natural do vírus pois é um dos mecanismos pelo qual o vírus “ilude” o sistema imunitário do hospedeiro (6).

## 2.3 Replicação viral

O mecanismo de entrada do VHC envolve várias etapas começando pela adesão à parede celular das células do hospedeiro, tradução e replicação do seu genoma até à libertação de novas partículas virais. Este é um processo dinâmico resultante de interações específicas entre componentes do próprio vírus, proteínas do seu invólucro e múltiplos fatores celulares (6, 24).

### 2.3.1. Entrada na célula

O ciclo replicativo viral do VHC é um processo lento e complexo (17). Inicia-se com a ligação do vírus à membrana das células do hospedeiro, processo este que envolve tanto as proteínas estruturais do vírus como moléculas recetoras da superfície celular dos hepatócitos (24, 46). As proteínas E1 e E2 são essenciais para a entrada do vírus na célula, assim como as moléculas da superfície celular CD81, o recetor *scavenger* B tipo 1 (SR-B1) e claudina-1 (6, 17) (Figura 4). Após a adesão celular, o vírus é direccionado para as *tight junctions* da célula do hospedeiro, facilitando assim a sua integração celular (24). Pensa-se que o facto da entrada do vírus ter o “apoio” das lipoproteínas, permitirá que este possa escapar ao sistema imunológico do hospedeiro (10, 17).

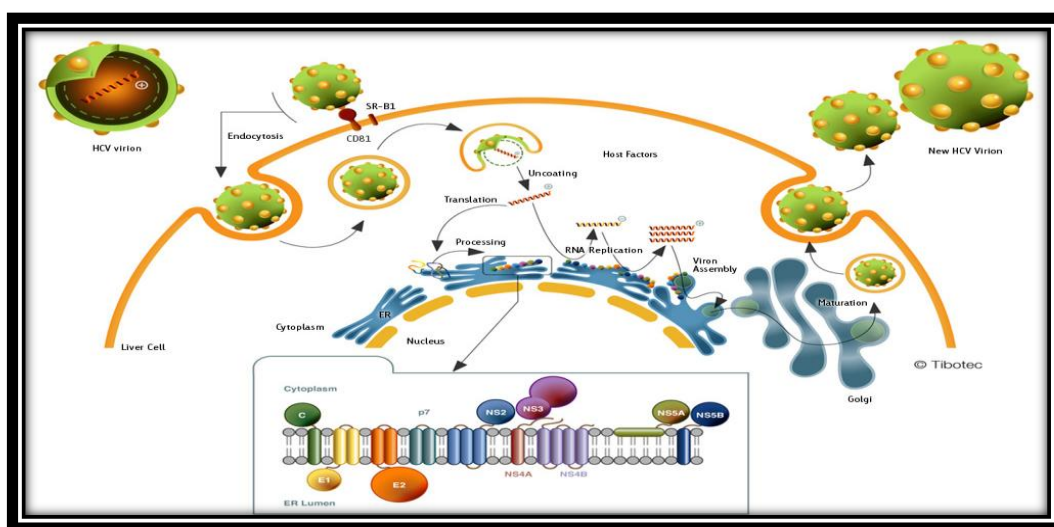


Figura 4 - Entrada na célula do hospedeiro e replicação do vírus da Hepatite C ([www.tibotec.com](http://www.tibotec.com))

### **2.3.2. Tradução e processamento da poliproteína**

Após a fusão com a célula hospedeira, o vírus liberta no citoplasma celular uma cadeia de RNA de polaridade positiva. Esta cadeia simples irá servir de RNA mensageiro (RNAm) para a síntese de uma nova proteína (46). Na região 5' inicia-se a tradução através da ligação do RNAm às subunidades 40S e 80S do ribossoma através do IRES (3, 6, 9, 17). A tradução do genoma viral conduz à formação de uma poliproteína que é posteriormente processada por proteases celulares e virais, as quais irão dar origem às proteínas estruturais e não estruturais do vírus.

### **2.3.3. Replicação do vírus**

A cadeia de RNA de sentido positivo serve de molde à síntese de uma cadeia de RNA intermédia de sentido negativo, cadeia esta que irá servir de molde à formação de múltiplas cadeias de sentido positivo (10, 46). Após a maturação das proteínas no retículo, a proteína do *core* forma o nucleocápside e as proteínas E1 e E2 formam a membrana lipídica. As novas partículas virais são depois libertadas da célula através de vesículas citoplasmáticas lipídicas, mais concretamente através da associação a *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL) (6, 24).

## **3. Transmissão do VHC**

### **3.1. Vias de transmissão do VHC**

As vias de transmissão do vírus da hepatite C são várias, podendo ser divididas em três grupos: a transmissão por via parentérica, a não parentérica e a de etiologia desconhecida (6).

A via parentérica inclui a transmissão do VHC pela partilha de seringas e agulhas infetadas (utilizadores de drogas injetáveis), os acidentes de trabalho dos profissionais de saúde com agulhas contaminadas (aqui a percentagem de contágio em doentes com carga viral positiva, é de 0,5%) (47), e também, na transplantação de órgãos. Por fim, as transfusões de componentes sanguíneos e seus derivados, que antes da introdução dos testes de rastreio

de anticorpos contra o VHC (anti-HCV) (3, 6, 33, 48), eram responsáveis por 80% das infecções pós-transfusionais nos Estados Unidos, Europa e Ásia. Por último, a transmissão por receção de fatores de coagulação antes de 1987 (Hemofílicos) (33) completa as vias de transmissão parenteral.

A transmissão não parentérica engloba a transmissão por via sexual, embora com uma prevalência muito baixa (0 a 3%) (6, 18, 48) e também mas pouco frequente, a transmissão vertical, ou seja, de mãe para filho durante o parto (1 a 3% quando o RNA viral materno é baixo e 5% quando o RNA viral é muito elevado) (6, 18, 49-50). Existe ainda pouco conhecimento na generalidade da população quanto às vias de transmissão do vírus sendo que, estas muitas vezes, são “incluídas” em alguns atos comuns e banais do dia a dia e que nada têm a haver com a transmissão da doença, como é disso exemplo, o abraço, o beijo, a partilha de utensílios de cozinha ou ainda a própria amamentação (6, 33).

### 3.2. Evolução natural do vírus

Variando naturalmente de indivíduo para indivíduo, entre as 2 e 8 semanas após o contágio (28, 51) a pesquisa de anticorpos contra o vírus é positiva, enquanto o RNA pode ser detetado precocemente ao fim de uma a duas semanas após a exposição ao vírus (52). A história natural do vírus é difícil de estabelecer devido à ausência de sintomatologia. No entanto, a maioria dos casos evolui de acordo com a seguinte representação (Figura 5):

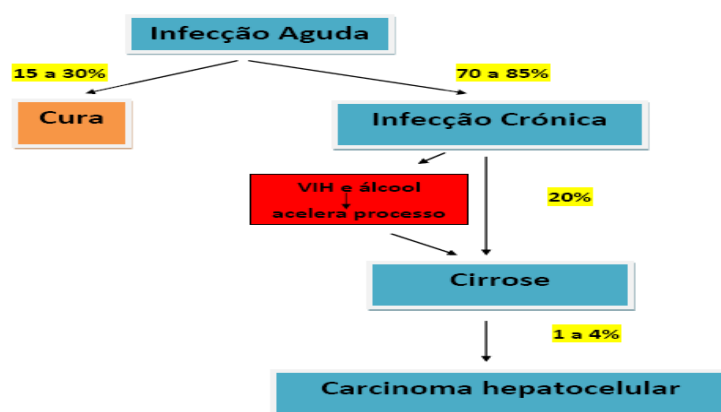


Figura 5 - História natural do VHC (adaptado de [www.Hepatologytextbook.com](http://www.Hepatologytextbook.com))

#### 4. Diagnóstico laboratorial do VHC

Nos primeiros anos da doença, esta é assintomática (6) podendo ser confundida com uma simples gripe. O diagnóstico é geralmente feito de forma acidental: na triagem de dadores de sangue, em rotinas laboratoriais durante a gravidez ou em simples análises de rotina com observação da alteração dos valores das transaminases hepáticas (6-7, 14).

O diagnóstico baseia-se em ensaios serológicos altamente sensíveis e específicos para a deteção de anticorpos anti-HCV (1, 18, 33, 41, 53-54), podendo ser ensaios imunoenzimáticos como exemplo *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (E.L.I.S.A) ou por quimioluminescência (C.L.I.A) (11), para além do doseamento da ALT (7, 29), sendo “confirmado” posteriormente a existência desses anticorpos por técnicas suplementares mais específicas - *Recombinant Immunoblotting Assay* (RIBA) ou *Line Immuno Assay* (InnoLia) (14, 41, 53) e finalizado com a deteção do RNA do próprio vírus (33-35, 41, 53-57).

Desde que foi descoberto o vírus da hepatite C, vários foram os testes desenvolvidos para a sua deteção (14, 44). A pesquisa laboratorial de anticorpos contra o VHC só é possível em média 45 a 60 dias após a infeção pelo vírus (6, 28, 53-54) enquanto a deteção do RNA permite reduzir este período para cerca de 12 dias. Recentemente, a quantificação do antígeno do *core* do vírus veio permitir detetar a existência de replicação viral ativa (55, 58) apenas com um ou dois dias de atraso em relação à deteção do RNA viral (35, 52), reduzindo o período de janela para cerca de 14 dias (Figura 6).

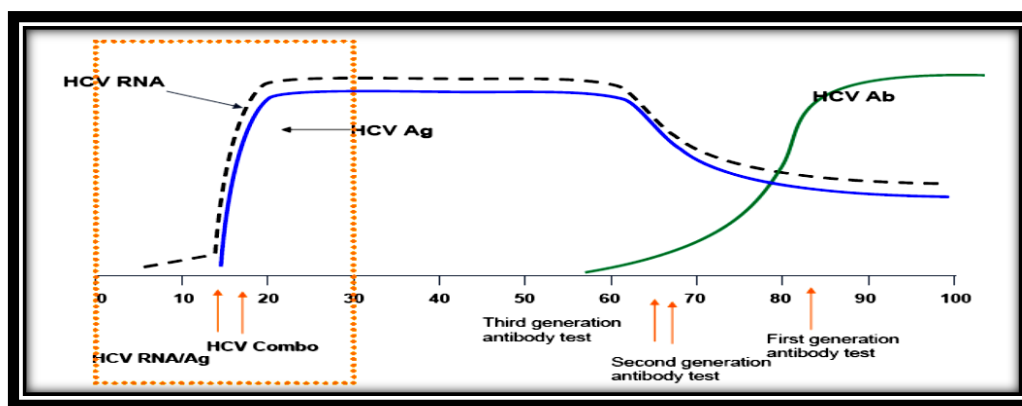


Figura 6 - Período de janela do VHC para os vários marcadores virais; RNA, HCV Ag *core*, HCV Combo e HCV Ac. (www.abbott.com)



#### **4.1. Ensaios imunoenzimáticos (E.L.I.S.A.)**

Os testes de primeira geração surgiram em 1990 (5) e tinham uma sensibilidade de 70-80% (14) com um tempo de seroconversão de 16 semanas. A segunda geração surge em 1992 já com uma sensibilidade de 92-95% e com um tempo de seroconversão de cerca de 10 semanas (14). A terceira geração já com uma sensibilidade cerca de 99% (11, 33) aparece em 1994 com um período de seroconversão entre 7-8 semanas. Atualmente, a deteção de anticorpos anti-HCV no plasma ou soro humano é baseada em ensaios imunoenzimáticos de terceira geração que utilizam vários antígenos sintéticos da proteína estrutural do *core* e várias proteínas não estruturais NS3, NS4 e NS5 (14). A sua elevada sensibilidade favorece o aparecimento de resultados falsos positivos e por isso, a deteção de anticorpos para o vírus tem de ser feita recorrendo a técnicas complementares mais específicas (14) como é exemplo o RIBA III - Chiron<sup>®</sup> e também o teste INNO-LIA<sup>™</sup> HCV Ab III - Innogenetics<sup>®</sup> (11, 59).

No entanto, já existem também no mercado testes que pesquisam concomitantemente antígenos e anticorpos do VHC, como exemplo HCV Ag/Ab Ultra – BIO-RAD<sup>®</sup>, HCV Ag/Ab Murex<sup>®</sup>, testes que permitem a redução do período de janela para cerca de 2 semanas para a pesquisa do antígeno.

#### **4.2. Quimioluminescência (C.L.I.A.)**

A *Chemiluminescent Immunoassay* (C.L.I.A.) é uma técnica altamente sensível (53) cujo princípio assenta na quantificação da fluorescência emitida por uma determinada molécula/partícula. A determinação destas é feita por medição da fluorescência emitida no final do procedimento analítico, com a respetiva medição de unidades relativas de luz (RLU) (30, 51). Existe então uma relação direta entre a quantidade de partículas que se pesquisa e a quantidade de RLU (30) detetada pelo equipamento (22). É uma técnica com elevada sensibilidade, de fácil introdução na orgânica laboratorial, com fraca possibilidade de sofrer contaminações (54) e que fornece o resultado ao fim de 40 minutos (55).

Existem no mercado vários testes de pesquisa de anticorpos anti-HCV e antígeno do *core* do VHC que utilizam este método, dando como exemplo dos laboratórios Abbott Diagnostics<sup>®</sup>, o teste Anti-HCV e o HCV Ag *core*.

#### 4.3. Testes de Biologia Molecular

A detecção do RNA do vírus pode ser feita recorrendo a vários testes de biologia molecular podendo estes ser qualitativos ou quantitativos.

São exemplo dos testes qualitativos, a técnica de PCR por transcrição reversa (RT-PCR) da Roche<sup>®</sup> (Cobas Amplicor HCV v2.0) (11) com uma sensibilidade de 50 UI/ml e a *Transcription Mediated Assay* (T.M.A.) da Siemens<sup>®</sup> (Procleix Ultrio Plus) com uma sensibilidade de 3.1 UI/ml.

Como testes quantitativos, a técnica de *branched* DNA (bDNA) da Siemens<sup>®</sup> (Versant HCV RNA 3.0 Assay) (14) com uma sensibilidade de 650 UI/ml, e a PCR em tempo real (PCR-RT) da Roche<sup>®</sup> (Cobas<sup>®</sup> Taqman<sup>®</sup> HCV test) (11), cujo limiar de sensibilidade é de 15 UI/ml sendo este, o método de eleição para a monitorização da carga viral de doentes com hepatite C (33).

##### 4.3.1. Genótipo

A determinação do genótipo para um doente com hepatite C é crucial na medida em que o tratamento a que este será submetido é proposto em função do genótipo apresentado. Sabe-se que os genótipos 2 e 3 têm melhor resposta ao tratamento do que os genótipos 1 e 4 (27, 33). No mercado existem vários métodos de determinação do genótipo do VHC como é exemplo o *Nested* PCR, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), hibridização reversa (Inno-Lipa) e sequenciação direta da região 5' (TruGene<sup>®</sup>) (14).

##### 4.3.2. Carga viral

A quantificação da carga viral é importantíssima para o acompanhamento da terapêutica do doente com hepatite C na medida em que, permite ao clínico avaliar até que ponto a

terapêutica instituída em função do genótipo do vírus, está a ter, ou não, sucesso. A PCR-RT é o método de referência na quantificação do vírus. O teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV da Roche® oferece resultados quantitativos precisos, dado que a monitorização do amplicon é efetuada durante a fase exponencial de amplificação. Quanto mais elevada for a carga viral da amostra, mais cedo surge a fluorescência do corante sinalizador da sonda acima do nível de fluorescência da linha base (Figura 7).

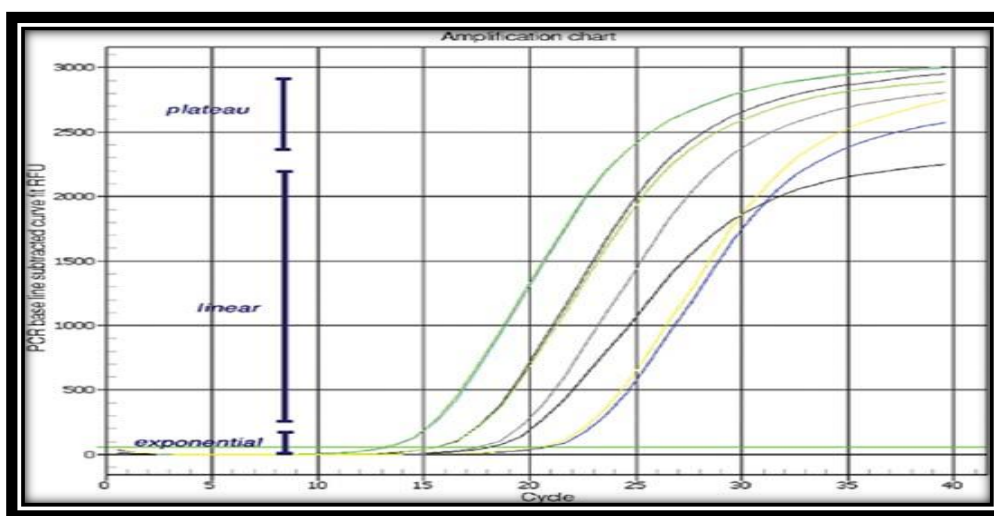


Figura 7 - Esquema da curva típica da PCR em tempo real (www. media.wiley.com)

#### 4.4. Parâmetros bioquímicos

A determinação da ALT (7) é um parâmetro bioquímico barato, simples e bastante útil no diagnóstico da hepatite C, pois é um marcador de alteração hepática mas que, por si só, não o confirma. Este doseamento pode complementar a avaliação da evolução da doença e ajudar a monitorizar a resposta à terapêutica no intervalo dos testes de quantificação do vírus, embora se possa manter elevado mesmo depois da eliminação viral. De facto, a cinética desta enzima assemelha-se a uma onda, pois está muitas vezes alterada devido a outros fatores como por exemplo, álcool e fármacos, mas também está muitas vezes normal no decorrer do processo terapêutico. Este facto faz com que a hepatite C seja denominada também de hepatite “*ondulante*” devido à própria variação do resultado da ALT.

## 5. TERAPÊUTICA

A infecção pelo VHC pode ser tratada mas, acarreta custos elevados, pois requer monitorização a longo prazo e está dependente de fatores do hospedeiro tais como, a idade (<40 anos tem melhor prognóstico), sexo (feminino tem melhor recuperação), raça, obesidade, a carga viral antes do tratamento, se existe coinfeção com outro vírus, o grau de lesão hepática, o genótipo associado à doença (16, 18, 24, 45) e não menos importante, o grau de adesão do próprio doente ao tratamento proposto pelo clínico (33). Normalmente o tratamento é iniciado após a definição médica de que o doente é portador de hepatite C crónica, ou seja que: pelo menos durante seis meses seguidos, é possível laboratorialmente quantificar a carga viral do vírus, assim como, detetar a presença de anticorpos para o mesmo (6, 51), associando também, o resultado da biopsia hepática (33). O tratamento tem como objetivo obter uma resposta virológica mantida (RVM), isto é, que a pesquisa do RNA viral por uma técnica sensível de PCR se mantenha indetetável pelo menos 24 semanas após o *terminus* do tratamento (20, 27, 33, 35, 55). No entanto, é reconhecido que doentes com um valor de carga viral alta têm mais dificuldade em eliminar o vírus durante a terapêutica (45). Estudos efetuados no âmbito do tratamento e cura de doentes com hepatite C indicam que, entre 55 a 85% dos indivíduos portadores do vírus irão continuar infetados e que, a cura espontânea para a doença aguda é mais comum entre crianças e mulheres jovens do que entre adultos (33).

Atualmente, a terapêutica consiste no uso combinado do interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) em conjugação com Ribavirina (RBV) (3, 9, 16-17, 24, 26, 33, 36, 45) durante 24 a 48 semanas (16, 51, 60-61). Este tipo de tratamento é normalmente acompanhado de sucesso em pacientes com genótipo 2 e 3, correspondendo a cerca de 80% de cura (18, 20, 24, 27, 45, 61). No entanto, em doentes com genótipos 1 e 4, este sucesso diminui para 50% (18, 20, 27, 33, 36, 45-46, 61). Atualmente para doentes com o genótipo 1 e cujo tratamento usual falhou, é recomendado o uso do interferon com Ribavirina e ainda um inibidor de protease (Teleprevir ou Boceprevir) atingindo assim uma taxa de 50 a 60% de cura (45, 61).

### 5.1. Interferon Peguilado e Ribavirina

Os interferons são proteínas normalmente secretadas pelas células em resposta a infeções virais (45) enquanto a Ribavirina (1-beta-D-ribofuranosil-1, 2, 4-triazol-3-carboxamida) é uma purina análoga à guanosina que, após fosforilação intracelular, atua como inibidor da RdRp e induz também a resposta do hospedeiro, induzindo-o a libertar células *T-helper* (TH1) (45). Os interferons podem ser divididos em três classes; a classe I onde se encontram os interferons  $\alpha$  e  $\beta$ , a classe II onde se encontra o interferon  $\gamma$  e a classe III onde se encontra o interferon  $\lambda$  (62). O interferon peguilado resulta da união da molécula do interferon com uma molécula de polietilenoglicol (PEG) (33). O PEG tem como objetivo modificar o interferon convencional, envolvendo-o, permitindo que o organismo não o reconheça como estranho. Assim, o PEG é capaz de permanecer mais tempo no hospedeiro prolongando a sua ação. Esta utilização do PEG permite fazer tratamento apenas com uma toma semanal comparativamente aos doentes que fazem tomas diárias de interferon normal. Este método, permite também diminuir os efeitos secundários da medicação bem como melhorar assim a qualidade de vida dos doentes. Existem dois tipos de interferon peguilado; o INF- $\alpha_{2a}$  e o INF- $\alpha_{2b}$  (18). O primeiro tem uma molécula de PEG com cerca de 40 Kda enquanto o segundo tem uma molécula de PEG com cerca de 12 Kda (18, 33). Esta diferença de peso molecular tem implicações tanto na farmacocinética como na farmacodinâmica do interferon. O primeiro tem uma distribuição intersticial e é metabolizado no fígado enquanto o segundo está presente principalmente nos tecidos e é metabolizado primeiro nos rins e só depois no fígado (18). Estas diferenças são importantes na medida em que, a prescrição de um ou do outro é feita com base no genótipo do doente, o interferon  $\alpha_{2b}$  é administrado em doses variáveis de acordo com o peso corporal do doente enquanto o interferon  $\alpha_{2a}$  é administrado em doses fixas visto que, o peso do doente não interfere com a dosagem (62). As recomendações internacionais para a combinação do interferon/Ribavirina são as seguintes (18, 27, 33) (Tabela I):

Tabela I - Recomendação Mundial para o tratamento da Hepatite C

GENÓTIPO	PEG-INTERFERON	RIBAVIRINA	DURAÇÃO
1 e 4	$\alpha_{2a}$ – 180 $\mu$ g/semana	1,000 mg $\leq$ 75Kg ou 1,200 mg > 75Kg	48 Semanas
	$\alpha_{2b}$ –1,5 $\mu$ g/Kg/semana	800 mg < 65Kg 1,000 mg 65-85Kg 1,200 mg 85-105Kg 1,400 mg >105Kg	
2 e 3	$\alpha_{2a}$ – 180 $\mu$ g/semana	800 mg/dia	24 Semanas

No entanto, quase todos os pacientes tratados com interferon e Ribavirina experimentam reações adversas tais como, fadiga, dor de cabeça, febre, depressão, irritabilidade e insónias. Além destas, podem surgir alterações laboratoriais tais como neutropenia, anemia e ainda anemia hemolítica que deriva especificamente do uso da Ribavirina (18, 33).

## 5.2. Perspetivas futuras

Com o avanço no conhecimento e entendimento do mecanismo de infeção do VHC, começaram a surgir novas abordagens de combate ao vírus e à sua erradicação do hospedeiro. Atualmente, a indústria farmacêutica tem tentado desenvolver inibidores tanto da entrada do vírus na célula como da sua posterior replicação (9, 23). No entanto, estes têm revelado problemas a nível de toxicidade assim como a nível de resistência viral. Muitos destes estudos ainda se encontram em fases iniciais pelo que, algumas destas possíveis alternativas terapêuticas, não estejam ainda a ser usadas em prática clínica.

### 5.2.1. Inibidores da entrada na célula do hospedeiro

O combate ao VHC começa logo pela tentativa de bloquear a entrada do mesmo nas células do hospedeiro. Estão assim em estudo, o PD 404, PD 182, a *Fluplenazine*, *PCperazine* e o *Trifluperazine* (9) e a lectina cianovirina-N (CV-N) que atua no processo

de entrada do vírus na célula na medida em que esta se liga às glicoproteínas do envelope, inibindo assim, a interação da proteína E2 e do CD81 (23). Inibidores como a loganina e a verbelina têm também um papel importante na inibição da entrada do vírus na célula (23) assim como as estatinas (mevastatina e sinvastatina) que são drogas que têm ação sobre o metabolismo dos lípidos, podem ser usadas também como inibidores da entrada do vírus na célula (23).

### **5.2.2. Inibidores da replicação viral**

Durante o processo de replicação viral, as proteínas NS3 e NS4a e NS5b têm um papel vital e, por isso, têm sido objeto de estudo por parte da indústria farmacêutica com a criação de inibidores para as mesmas. O SCH503034 (Boceprevir) que bloqueia a ação da NS3, o VX-950 (Teleprevir) que inibe tanto a NS3a como a NS4a (6, 9, 62), o TMC-435350 e o ITMN-191 inibem a protease NS3/4a (6, 9-10). O NM283 e R1626 e o AG-021541 (6, 9) são três inibidores da proteína NS5b. Estas moléculas inativam a RNA polimerase que é fundamental no processo de replicação do vírus (62).

### **5.2.3. Outros inibidores em estudo**

Outro objeto de interesse da indústria farmacêutica, é uma pequena porção de RNA conhecido como micro-RNA (miRNA) que está presente em abundância no fígado (3). Micro-RNA são cadeias simples de RNA com cerca de 22 nucleótidos que regulam a expressão de 30% de genes codificadores de proteínas. Estes, atuam na região não codificante 3' do RNAm levando à sua degradação ou inibição. Surpreendentemente, foi encontrado no genoma do vírus um local específico de ligação da molécula miR-122 que não se encontra na região 3' mas sim na região 5'. Mais surpreendente ainda é o facto de esta molécula ter um efeito contrário no vírus, ou seja, a sua presença protege o genoma viral da degradação (3). Está em estudo o uso de moléculas complementares a estes micro-RNA de modo a que estabeleçam ligação entre eles inibindo a sua atividade (63).

#### **5.2.4. Vacina**

Existem já alguns avanços na tentativa de obter uma vacina capaz de prevenir a infeção por hepatite C. O péptido sintético IC41, contendo epítetos de células T do vírus, tem sido referido na comunidade científica como seguro. Este induz a secreção de células T CD4+ e CD8+ em indivíduos saudáveis assim como de células TH17Tc1 (23) . Também tem sido demonstrado que, o composto MF59 (19), vacina composta por anticorpos contra a região E2, poderá ser eficaz na luta contra o vírus (10, 19). No entanto, como qualquer vírus de RNA, a sua elevada taxa de mutação e o facto de as novas partículas virais serem formadas por material lipídico do hospedeiro, torna difícil a criação de uma vacina (23).



## ***Capítulo II***

### Objetivos

## 1. OBJETIVOS

Sendo o vírus da hepatite C, um dos responsáveis pela infeção do fígado que pode resultar em hepatite crónica, cirrose hepática e em última instância, carcinoma hepatocelular (53), e tendo em conta que esta é uma doença que afeta cerca de 170 milhões de pessoas em todo o mundo (28, 64), é pertinente avaliar o uso de novos testes de quantificação do vírus da hepatite C comercializados no mercado.

O diagnóstico e a monitorização de infeções por hepatite C são baseados em testes de deteção de anticorpos contra o vírus bem como a quantificação da carga viral do mesmo. A pesquisa de anticorpos não distingue entre infeção ativa ou passada (11) e as técnicas de biologia molecular, com as suas particularidades, podem sofrer contaminações durante a sua execução originando falsos positivos, são técnicas que requerem profissionais altamente especializados e não menos importante, são bastante dispendiosas (5, 8, 41, 51, 53, 64). Com o aparecimento no mercado em março de 2009 do teste de quantificação do antígeno do *core* do VHC (HCV Ag *core*) da empresa Abbott Diagnostics® (64), tornou-se importante comparar este novo teste com a quantificação do RNA viral por PCR em tempo real. O antígeno do *core* do vírus está presente no soro de indivíduos infetados com o vírus, provavelmente em forma de viriões completos e/ou partículas proteicas do *core* do vírus (22). Estudos anteriores demonstram que a cinética do antígeno do *core* é similar à do próprio RNA durante todo o processo infeccioso (28, 41, 65) e que ambas as técnicas de quantificação do VHC estão bem correlacionadas (28, 64).

Por estes motivos definiram-se os seguintes objetivos para este trabalho:

**1- Objetivo principal** – Avaliar a utilidade clínica do teste ARCHITECT® HCV Ag *core* Abbott Diagnostics® no diagnóstico de infeção por VHC utilizando como metodologia a comparação dos resultados deste teste com a técnica de referência COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV

## **2– Objetivos secundários**

**2.1.** Estudar a sensibilidade e especificidade do teste ARCHITECT® HCV Ag *core* Abbott Diagnostics®

**2.2.** Analisar o impacto do genótipo na quantificação do antígeno do *core* do vírus

**2.3.** Estudar a possibilidade de utilização do teste ARCHITECT® HCV Ag *core* Abbott Diagnostics® na monitorização de doentes a fazer tratamento para a hepatite C.

**2.4.** Avaliar a importância laboratorial do teste ARCHITECT® HCV Ag *core* Abbott Diagnostics® no diagnóstico precoce de hepatite C em doentes de alto risco (doentes em diálise, candidatos a transplantes hepáticos e acidentes de trabalho de profissionais de saúde).

## ***Capítulo III***

### **Material e Métodos**

## 1. MATERIAL E MÉTODOS

### 1.1. População em estudo

Foram selecionados soros de doentes infetados pelo VHC a fazer tratamento, que estavam a ser estudados laboratorialmente no Serviço de Sangue e Medicina Transfusional dos Hospitais da Universidade de Coimbra EPE (n=105). Da população estudada, 10 amostras eram referentes a doentes com PCR-RT negativa (grupo controlo) enquanto as restantes 95, correspondiam a 41 doentes, que englobaram resultados de PCR-RT negativa a PCR-RT fortemente positiva. A 28 destes, só foi possível estudar 2 amostras, enquanto que a 13 doentes, foi possível obter a 3ª amostra. Cronologicamente, a amostra nº1 de cada doente era a mais antiga enquanto a amostra nº3 a mais recente (Figura 8).

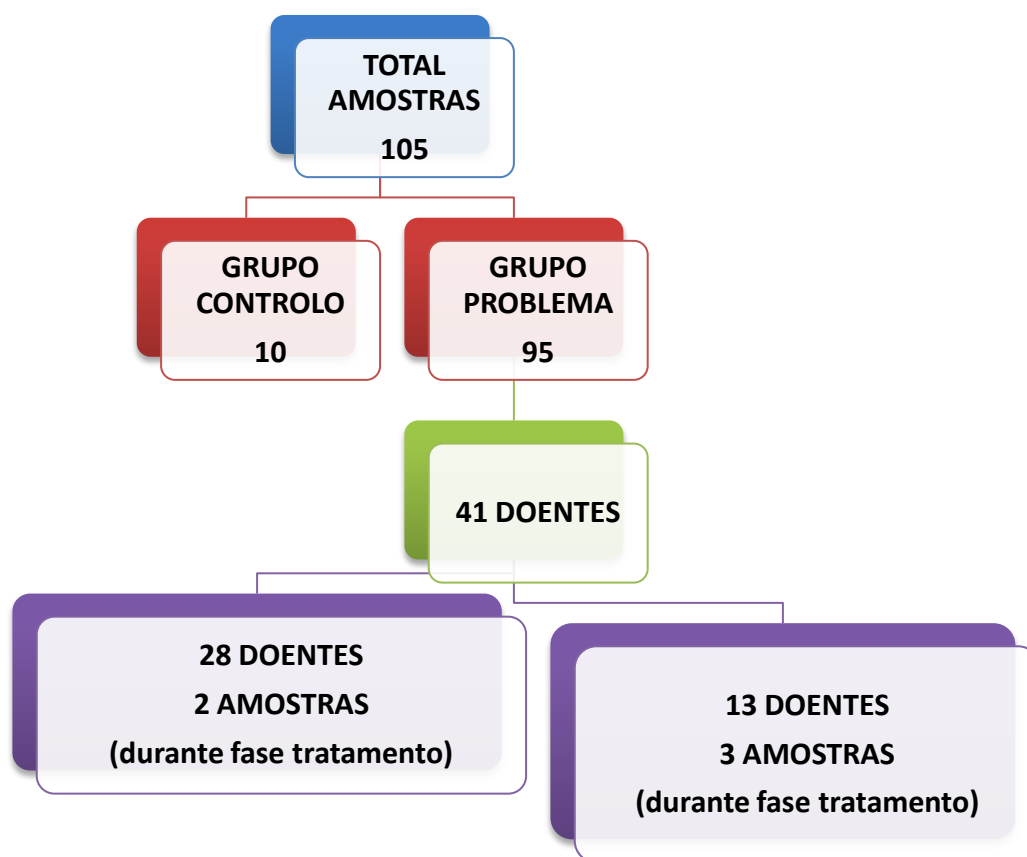


Figura 8 - Esquema da população estudada

## 1.2. Obtenção das amostras

De forma a correlacionar a carga viral do vírus da hepatite C com o respetivo antígeno do *core*, foram selecionadas amostras que abrangessem toda uma gama de positividade de resultados de PCR-RT assim como algumas amostras negativas. Foram estudadas de acordo com um padrão de estratificação previamente estabelecido, compreendendo amostras negativas, fracamente positivas, positivas e fortemente positivas para a quantificação da carga viral do VHC. Estas amostras foram analisadas no teste ARCHITECT® HCV Ag *core* Abbott Diagnostics® de forma a avaliar a sua sensibilidade e especificidade. Procurou-se também avaliar se os resultados negativos para a PCR-RT também eram para o teste em estudo. Para tal inseriu-se um grupo controlo (n=10) cujos resultados da PCR-RT eram inferiores ao limiar de sensibilidade do mesmo (<15 UI/ml). Assim, efetuou-se uma complexa pesquisa informática procurando resultados da carga viral por PCR-RT bem como os respetivos genótipos selecionando duas a três amostras de cada doente de modo a abranger o processo terapêutico de cada paciente, reunindo-se 41 doentes a que corresponderam 95 amostras. Todas as amostras usadas estavam congeladas a -70°C na seroteca do laboratório de Biologia Molecular de doentes do Serviço de Sangue e Medicina Transfusional.

## 1.3. Metodologia laboratorial

Aos doentes em estudo, foi efetuada colheita de sangue periférico para um tubo sem preparação de 8 ml o qual, após repouso para permitir a retração do coágulo, foi sujeito a uma centrifugação de 2680 rpm a 20°C durante 15 minutos. Após este procedimento, todos os soros foram separados e congelados a -28°C (orgânica instituída no laboratório) em tubos de reserva *ependorf*. Todas as amostras foram posteriormente analisadas de acordo com a disponibilidade e orgânica do setor de Biologia Molecular de doentes do Serviço, não excedendo normalmente 6 dias após o congelamento das mesmas. Após a realização da PCR-RT e os respetivos genótipos, ambos os tubos foram congelados a -70°C. A quantificação do antígeno do *core* do vírus no teste em estudo foi efetuada das reservas guardadas a -70°C das amostras selecionadas.

É importante referir que à data do início deste trabalho, todo o procedimento da PCR-RT e genótipagem já tinha sido efetuado.

A quantificação do VHC por PCR-RT é um procedimento automatizado onde só é necessária a introdução das amostras e dos reagentes nos equipamentos COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® enquanto que, para a realização do genótipo das amostras, não sendo um processo completamente automatizado e fechado, é realizado em três fases distintas (extração, amplificação e deteção), todas elas feitas em diferentes equipamentos. De seguida são descritos ambos os métodos.

### **1.3.1. PCR-RT**

O teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV é um teste de amplificação de ácidos nucleicos destinado à quantificação do RNA do vírus da hepatite C em plasma ou soro humano (51). A preparação das amostras é automatizada através da utilização do analisador COBAS® AmpliPrep. Este teste baseia-se em três processos distintos: [1] preparação da amostra para isolar o RNA do vírus, [2] transcrição reversa do RNA em DNA complementar (DNAc) e [3] amplificação simultânea por PCR do DNAc alvo e deteção da sonda oligonucleotídica duplamente marcada e clivada especificamente para o alvo (Figura 9).

O reagente da mistura principal contém *primers* e sondas específicas para o RNA alvo e para o RNA do padrão de quantificação. A deteção do DNAc amplificado, é efetuada através de uma sonda oligonucleotídica duplamente marcada, específica para o padrão de quantificação e para o alvo, permitindo assim a identificação do RNA alvo e do RNA do padrão de quantificação.

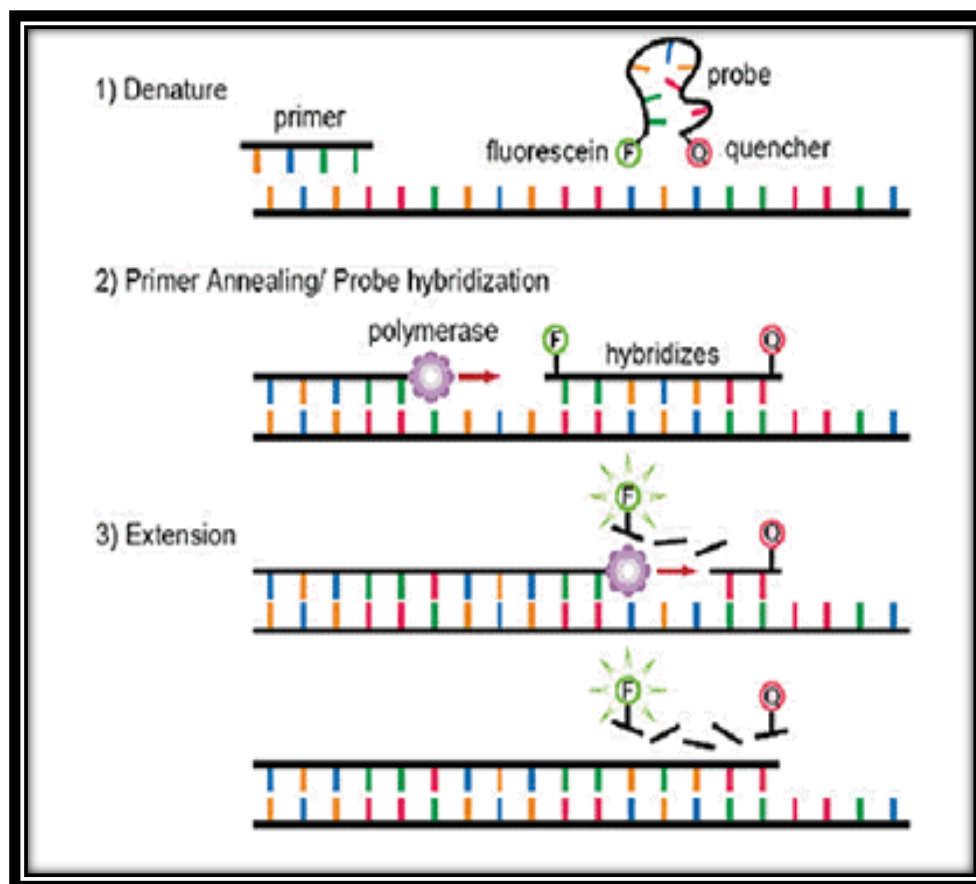


Figura 9 - Esquema da PCR em Tempo Real ([www.foodsafetywatch.com](http://www.foodsafetywatch.com))

A quantificação do RNA viral foi feita por comparação com o padrão de quantificação. Este, consiste numa cópia transcrita de RNA não infeccioso que contém sequências do genoma do vírus com locais de ligação ao *primer* idênticos aos do RNA alvo, e uma região única de ligação de sonda que permite que, o sinal emitido pelo padrão de quantificação se distinga do sinal emitido do RNA alvo. O padrão de quantificação é incorporado em cada amostra, sendo submetido aos passos da preparação das amostras, transcrição reversa, amplificação por PCR e deteção das sondas. O analisador calcula a concentração do RNA alvo presente nas amostras por comparação com o sinal emitido pelo padrão de quantificação presente em cada amostra e controlo. Os resultados obtidos são expressos em UI/ml, sendo definido como o limiar de sensibilidade, o valor de 15 UI/ml (53), ou seja, abaixo deste valor, o teste é considerado não reativo (carga viral não detetada).



A extração do RNA viral foi feita tendo como base uma técnica genérica de captura à base de sílica. Assim, 850 µl de plasma ou soro, foram incubados à temperatura ambiente na presença de uma protease em tampão caotrópico de lise/ligação, cuja função foi a de libertar o ácido nucleico e proteger o material genético libertado. De seguida, foi introduzida nova protease, o padrão de quantificação e partículas magnéticas de vidro, de modo a permitir a aderência do RNA alvo e do RNA do padrão de quantificação a estas. As substâncias não ligadas como sais, proteínas e outras impurezas celulares, foram removidas por lavagem das partículas magnéticas com o respetivo tampão de lavagem. De seguida, os ácidos nucleicos adsorvidos às partículas magnéticas foram eluídos à temperatura ambiente com uma solução aquosa. À amostra foi adicionada a mistura de amplificação tendo sido transferida posteriormente para o analisador COBAS® TaqMan® 48.

Para a reação de transcrição reversa e amplificação por PCR foi usada a enzima termo estável recombinante *Thermus specie*. Na presença de manganês ( $Mn^{2+}$ ) e sob condições de tamponamento adequadas, a enzima apresenta uma atividade simultânea de transcriptase reversa e de polimerase do DNA, o que permite que a transcrição reversa e a amplificação por PCR ocorram em conjunto com a deteção em tempo real do amplicon (molécula de dupla cadeia de DNA). A mistura ao ser aquecida permite a ligação do iniciador ao RNA alvo e ao RNA do padrão, que na presença de  $Mn^{2+}$ , permite que a enzima *Thermus specie* alongue os iniciadores ligados, dando origem a uma cadeia de DNA complementar ao RNA alvo.

Após a transcrição reversa do RNA alvo e do RNA do padrão de quantificação, ocorre desnaturação do híbrido DNAc e as sequências alvo específicas do *primer* são expostas. À medida que a mistura arrefece, os *primers* formam um anel com o DNA alvo. A *Thermus specie*, na presença de  $Mn^{2+}$  e trifosfatos de desóxinucleotidos em excesso (dNTPs), prolonga os iniciadores ligados ao longo do modelo alvo para produzir uma molécula de DNA de dupla cadeia denominada amplicon. A amplificação tem apenas lugar na região do genoma do vírus que se encontra entre os iniciadores não se aplicando a todo o genoma. O número de ciclos estipulado foi 40.

As sondas usadas para o VHC e para o padrão de quantificação estão marcadas com diferentes corantes sinalizadores fluorescentes. Quando as sondas estão intactas, a fluorescência do corante sinalizador é suprimida pela proximidade do corante supressor. Durante a PCR a sonda hibridiza-se a uma sequência alvo e é clivada pela atividade 5'-3' da *Thermus specie*. Quando os corantes de sinalização e de supressão são libertados e separados, a supressão deixa de ocorrer e é aumentada a atividade fluorescente do corante sinalizador. A amplificação do RNA viral e do RNA do padrão de quantificação, é determinada em diferentes comprimentos de onda sendo este processo repetido durante 40 ciclos. A utilização de sondas fluorescentes duplamente marcadas permite a deteção em tempo real da acumulação dos produtos da PCR pela monitorização da emissão da intensidade dos corantes sinalizadores fluorescentes libertados durante o processo de amplificação.

### 1.3.2. Genótipagem

A determinação do genótipo implica a realização de 3 passos fundamentais: extração do RNA viral seguido de uma PCR para a amplificação do material extraído e finalmente, a determinação do genótipo.

#### 1.3.2.1. Extração do RNA

A extração automática do RNA viral foi feita no equipamento NucliSens® EasyMAG™. O sistema NucliSens® EasyMAG™ baseia-se num método genérico de ligação de ácidos nucleicos de amostras biológicas complexas à sílica magnética.

O sistema funciona com uma amostra líquida, amostra essa que é misturada com um tampão de lise que contém um agente caotrópico. Qualquer matéria celular, partículas virais, bactérias ou fungos presentes na amostra serão corrompidas (lisadas) na presença do agente caotrópico, libertando dessa forma os ácidos nucleicos. O tampão de lise desativa quaisquer nucleases presentes na amostra. O processo de isolamento é iniciado pela adição de sílica magnética à amostra lisada. Os ácidos nucleicos presentes no lisado ligar-se-ão à

sílica sob condições altamente salinas. As partículas de sílica são então lavadas várias vezes, utilizando-se dois tampões de lavagem.

Em seguida, os ácidos nucleicos são libertados (eluídos) da sílica e concentrados num volume de tampão de eluição. Este processo de eluição é acelerado pela lavagem da sílica no tampão de eluição a uma temperatura elevada.

#### 1.3.2.2. PCR

Após a extração do material genético foi necessária a sua conversão para DNAc com consequente amplificação por PCR. Estes dois passos decorrem ambos no mesmo tubo sendo que todos os reagentes necessários à sua execução são adicionados no início do trabalho o que faz com que não seja necessário a abertura do tubo durante todo o procedimento diminuindo o perigo de contaminação. Em primeiro lugar, o RNA viral é convertido em DNAc e posteriormente amplificado obtendo-se produtos amplificados da região 5' e *core* do respetivo vírus.

Dos reagentes requeridos fazem parte a *ENZ MIX* (contém a transcriptase reversa) e a *AMP MIX* (contém oligonucleótidos,  $MgCl_2$  e tampão) (59). A preparação da *Master MIX* foi feita de acordo com o número de amostras a processar, de acordo com o seguinte cálculo:

$$(n \times 26\mu l \text{ AMP MIX}) + (n \times 4\mu l \text{ ENZ MIX})$$

n = número de amostras a amplificar

A 30  $\mu l$  da *Master MIX* foi adicionada 20  $\mu l$  de amostra extraída. Por fim, o processo de amplificação decorreu no termociclador *Thermocycle* tendo como definição o seguinte protocolo (Tabela II):

Tabela II - Protocolo de amplificação pós extração do RNA do VHC

Passo	Temperatura (°C)	Tempo	Nº Ciclos
<b>Transcriptase Reversa</b>	50°C ± 0.5°C	30 Minutos	1
<b>Ativação PCR</b>	95°C ± 0.5°C	15 Minutos	1
<b>Desnaturação</b>	95°C ± 0.5°C	30 Segundos	40
<i>Annealing</i>	50°C ± 0.5°C	30 Segundos	40
<b>Extensão</b>	72°C ± 0.5°C	15 Segundos	40
<b>Elongação</b>	72°C ± 0.5°C	2 Minutos	1
<i>Hold</i>	4°C ± 0.5°C	2 Horas	1

### 1.3.2.3. Genótipagem por hibridização reversa

O teste utilizado na determinação do genótipo foi o VERSANT<sup>®</sup> HCV Genotype 2.0 (LiPA) que utiliza o método de hibridização reversa (figura 10).

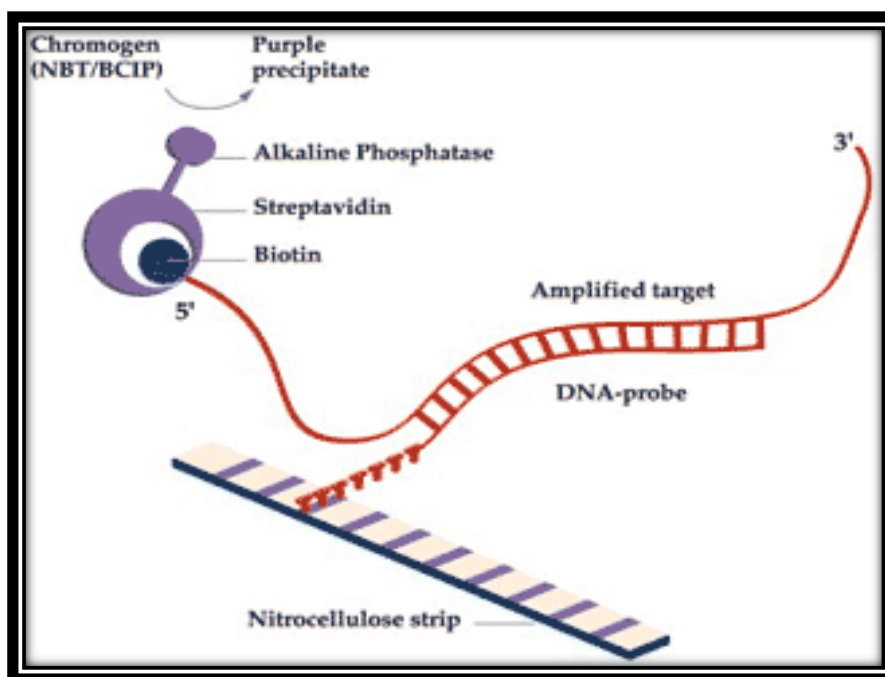


Figura 10 - Princípio do método baseado na hibridização reversa ([www.papillpmavirus.cz](http://www.papillpmavirus.cz))

O produto de DNA biotilado resultante da PCR, gerado através da amplificação da região 5' e região nuclear do RNA do vírus por RT-PCR, foi hibridizado com sondas

oligonucleotídicas imobilizadas. As sondas que estão ligadas a uma tira de nitrocelulose são específicas da região 5'.

Foram necessários 10 µl de amostra de produto de PCR para se efetuar a desnaturação da mesma que ocorreu com a adição da solução DENAT SOLN. Esta, atuou durante 5 minutos à temperatura ambiente. De seguida adicionou-se a cada tina, 2 ml de solução HYB/SW SOLN que incubou a 50 °C durante 60 minutos. Foi efetuado de seguida o procedimento de lavagem das tiras, pipetando-se 2 ml de solução HYB/SW SOLN em cada tina, em agitação durante 30 a 90 segundos. Este procedimento foi efetuado em duplicado. Posteriormente, adicionou-se 2 ml da solução de conjugado (estreptavidina marcada com fosfatase alcalina) às tiras de celulose. Após incubação de 30 minutos, e seguido de um novo processo de lavagens, adicionou-se 2 ml de substrato (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato e 4-nitro azul de tetrazólio). Este incubou à temperatura ambiente durante 30 minutos reagindo com o complexo de estreptavidina-fosfatase alcalina formando um precipitado de cor púrpura/castanha produzindo um padrão de bandas visível na tira de nitrocelulose. Após o desenvolvimento de cor, adicionou-se água destilada para finalizar o processo.

Nas tiras do ensaio VERSANT<sup>®</sup> HCV Genotype 2.0 (LiPA) existem 3 linhas de controlo e 22 linhas paralelas que contêm as sequências específicas para os genótipos 1 a 6 do VHC. A linha do controlo do conjugado monitoriza a reação de desenvolvimento de cor. Na linha 2, o controlo de amplificação contém sondas universais que hibridizam com o produto da PCR da região 5' UTR. O controlo da amplificação na linha 23, contém sondas universais que hibridizam com o produto da PCR da região nuclear. Os genótipos do VHC são determinados alinhando as tiras do ensaio com o cartão de leitura do ensaio VERSANT HCV Genotype 2.0 (LiPA) e comparando os padrões das linhas das tiras com os padrões de interpretação do ensaio (Figura 11).

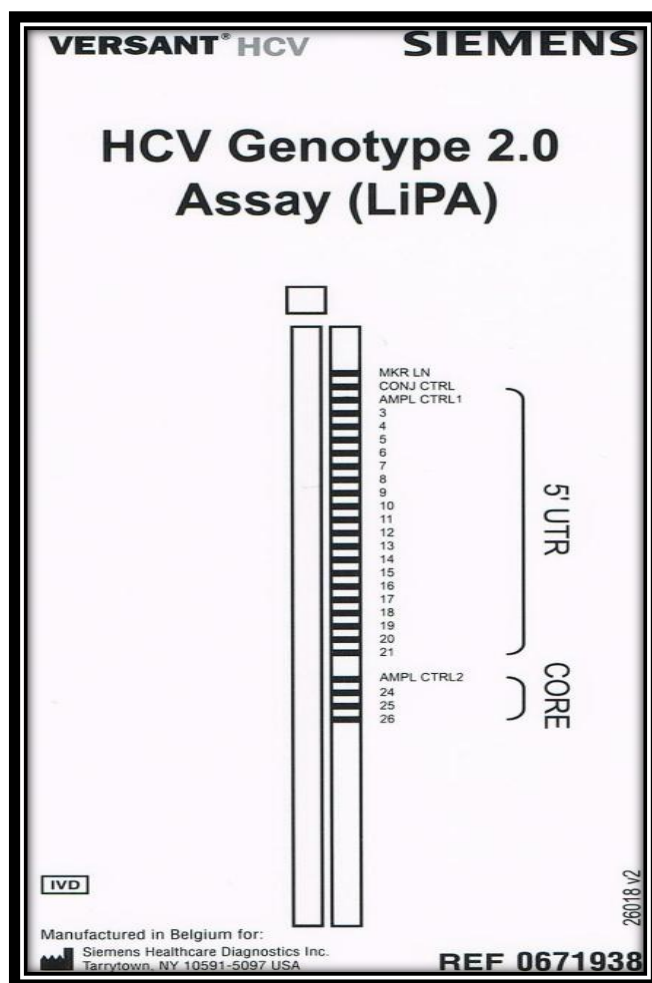


Figura 11 – Cartão de leitura do ensaio HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA) (www.siemens.com)

### 1.3.3. Quimioluminescência (C.L.I.A.)

A quimioluminescência (C.L.I.A.) é uma técnica sensível (53) que tem como fundamento teórico a quantificação da fluorescência emitida por uma determinada molécula/partícula. O teste ARCHITECT<sup>®</sup> HCV Ag *core* (34), em particular, é um imunoensaio de dois passos (22) que utiliza partículas eletromagnéticas na determinação do antígeno do *core* do vírus da hepatite C (22, 51). O processo analítico inicia-se com um pré-tratamento da amostra (incubação da amostra com o reagente de pré-tratamento 1 e 2) cuja função é dissociar os possíveis imunocomplexos existentes na amostra entre anticorpos anti-HCV e antígenos do *core* do vírus (28) (Figura 12).

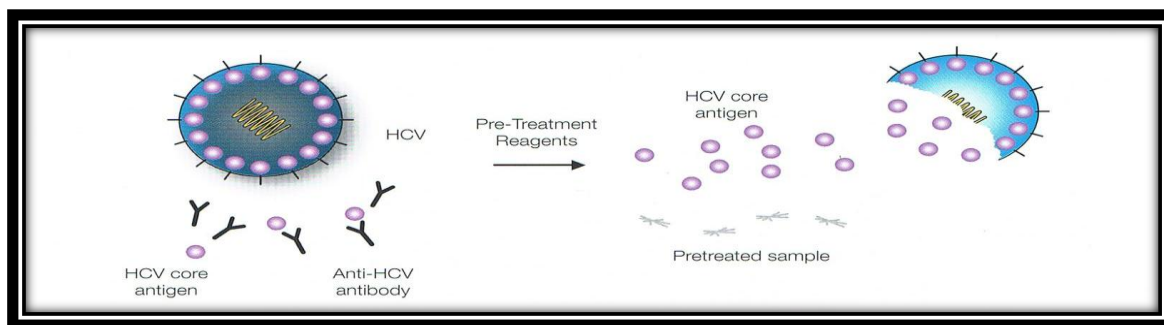


Figura 12 - Pré-tratamento das amostras na quantificação do HCV Ag core

Logo de seguida, é feita a incubação da amostra pré-tratada com micropartículas magnéticas recobertas com anticorpos antiantígeno do core do vírus (22, 28, 66) (Figura 13).

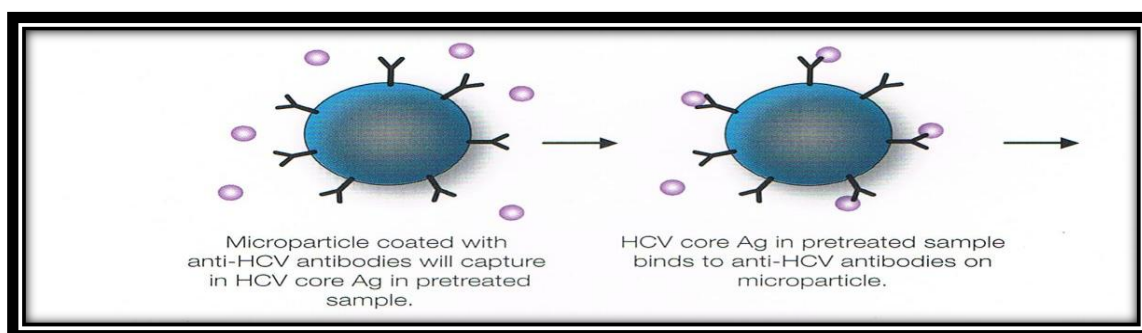


Figura 13 - Incubação da amostra pré-tratada com as micropartículas magnéticas

A fase seguinte compreende a adição de um segundo anticorpo marcado com acridium (conjugado), sendo por último, adicionado a solução pré-*Trigger* e a solução *Trigger* de modo a permitir a emissão de fluorescência (figura 14).

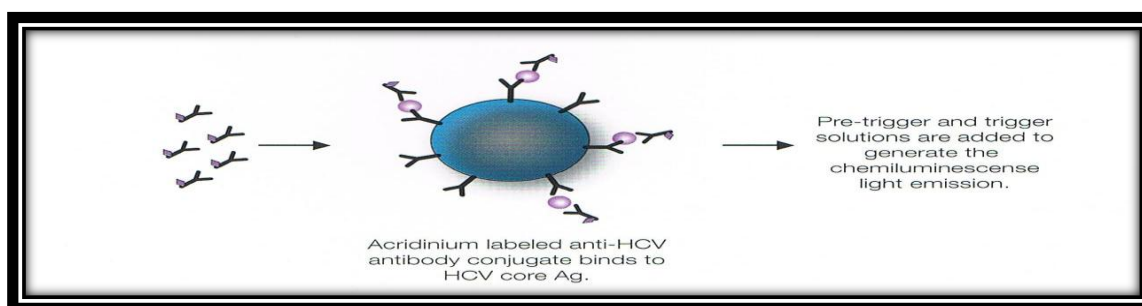


Figura 14 - Adição do conjugado e soluções reveladoras de fluorescência na técnica de quimioluminescência

A quantificação do antígeno do *core* do vírus é feita por medição dessa fluorescência emitida, ou seja, medição de RLU (22, 28, 30). Existe uma relação direta entre a quantidade de antígeno do *core* presente na amostra e a quantidade de RLU detetada pelo equipamento (22, 51, 55). Os resultados são expressos em fmol/L, sendo que, resultados inferiores a 3 fmol/L são considerados não reativos e  $\geq 3$  fmol/L são considerados reativos (53). No entanto, o fabricante recomenda confirmar os resultados cujo valor se encontre entre 3 e 10 fmol/L, nomeadamente repetindo o teste em duplicado (22, 51, 55).

#### **1.4. Tratamento estatístico**

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através do Microsoft Office Excel 2007 no que diz respeito à apresentação e organização da base de dados assim como na elaboração de gráficos. O programa estatístico SPSS versão 19.0 para o Windows XP foi utilizado para o tratamento, análise e correlação das variáveis em estudo, nomeadamente com a utilização do teste não-paramétrico de correlação de Spearman. Efetuou-se também a análise de Concordância – Kappa de Cohen, para a determinação do grau de confiança das variáveis em estudo.



## ***Capítulo IV***

Resultados

Discussão

## 1. RESULTADOS

Da população em estudo que compreendeu 41 doentes aos quais corresponderam 95 amostras, verificou-se que 75,6% eram doentes do sexo masculino e os restantes 24,4% pertenciam ao sexo feminino (Figura 15).

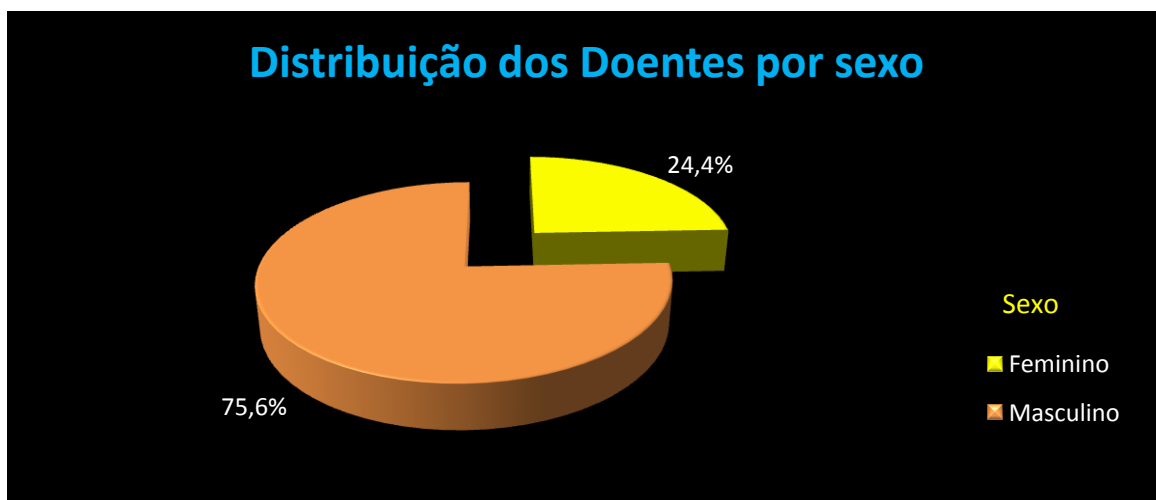


Figura 15 - Distribuição dos doentes do estudo por sexo

Dos doentes estudados, verificou-se que 6 deles se encontravam na faixa etária dos 20 aos 30 anos, 12 na faixa etária dos 31 aos 40 anos, 15 dos 41 aos 50 anos, 4 dos 51 aos 60 anos, 2 dos 61 aos 70 anos e 2 na faixa etária dos 71 aos 80 anos (Figura 16).

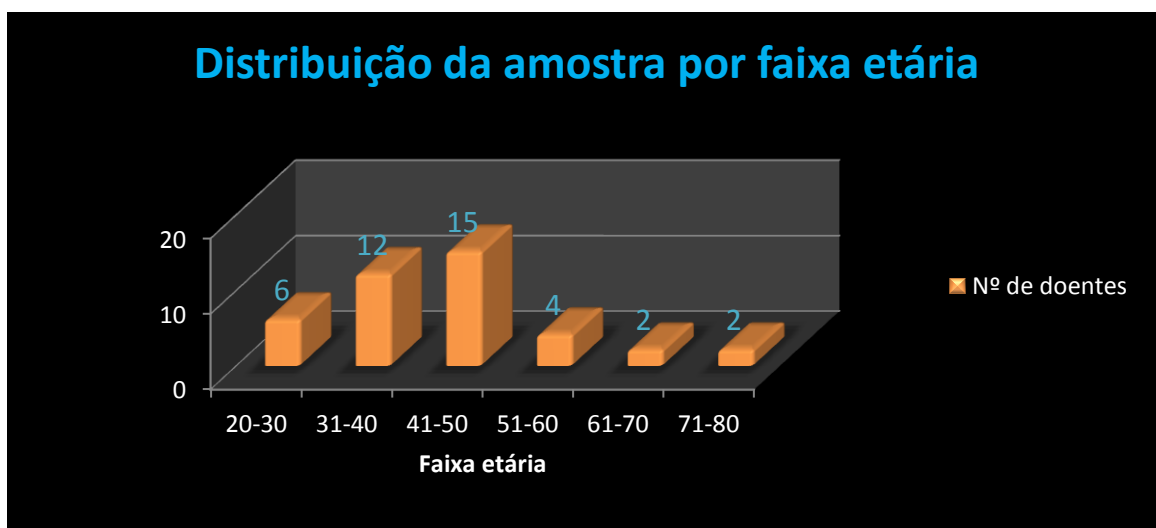


Figura 16 - Distribuição das amostras por faixa etária

Verificou-se que do intervalo etário dos doentes estudados, a idade mínima foi de 20 anos, e a máxima de 76 anos sendo a média de idades 42,3 anos (Figura 17).

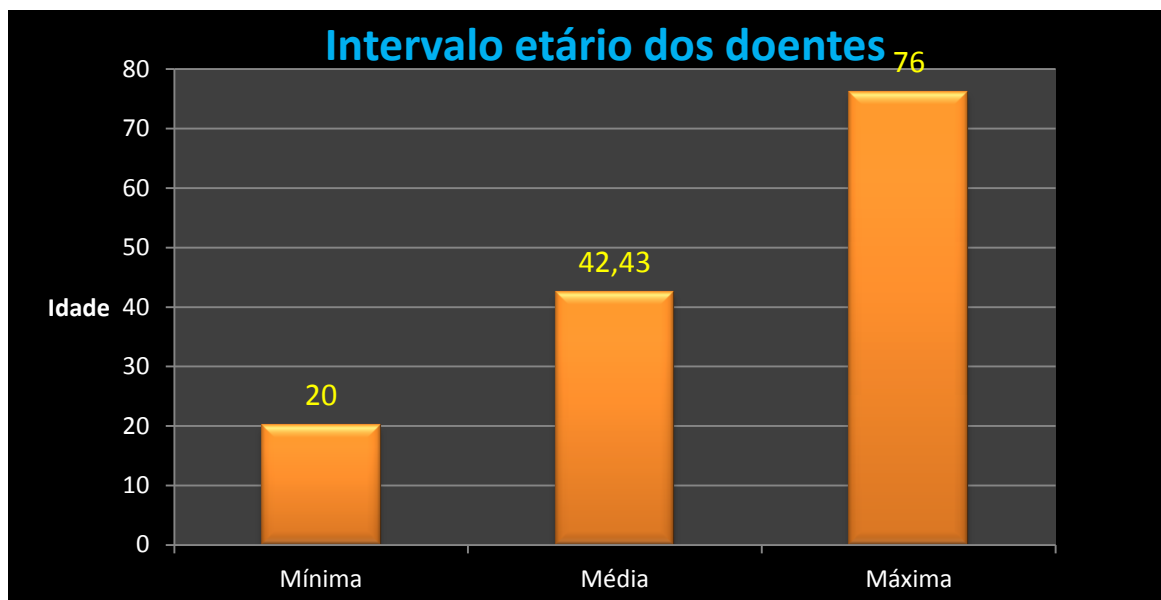


Figura 17 - Intervalo etário dos doentes estudados

Observou-se na generalidade dos doentes estudados, que o genótipo predominante foi o 1a (Figura 18).

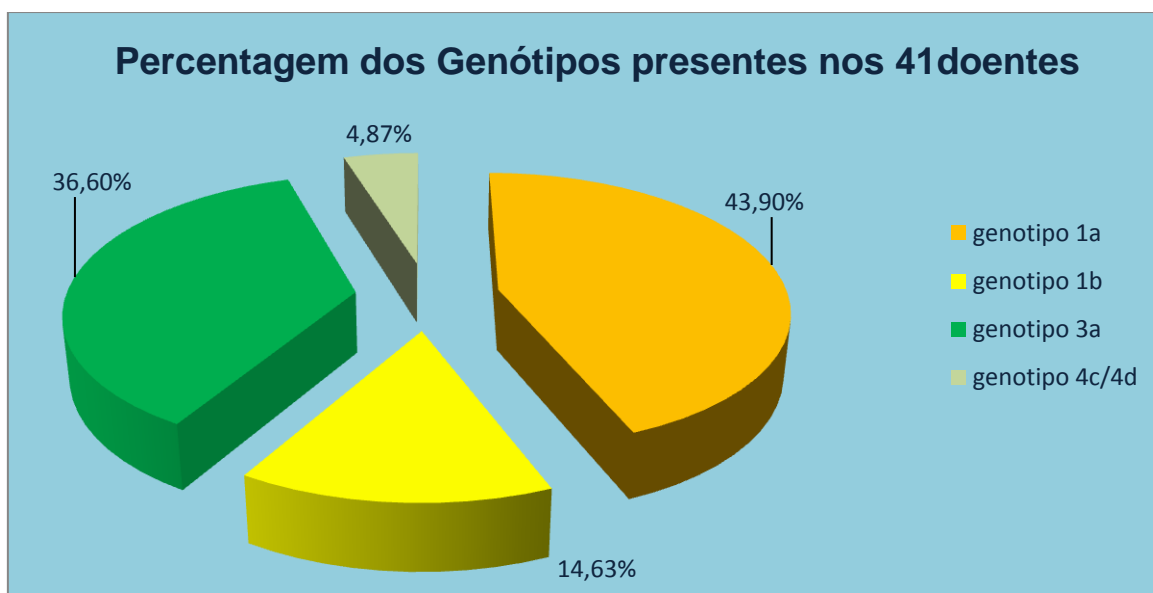


Figura 18 - Percentagem dos genótipos presentes nos 41 doentes

Das 95 amostras estudadas, 89 foram positivas para a quantificação do vírus por PCR-RT enquanto em 6 amostras se obteve um resultado de carga viral indetetável. Das 89 amostras positivas, apenas 67 foram reativas para a quantificação do antígeno do *core* do vírus enquanto as 6 amostras negativas para a PCR-RT, o foram não reativas para a o HCV Ag *core*.

Efetuuou-se uma tabela de diagnóstico de 2x2 (Tabela III) de modo a calcular a especificidade e sensibilidade dos resultados obtidos. Das 89 amostras positivas para a PCR-RT 67 foram positivas para a pesquisa do antígeno do *core* do vírus da hepatite C, obtendo-se uma sensibilidade de 75% (nº de amostras positivas em ambos os testes/nº total de amostras positivas). A especificidade foi calculada de acordo com os resultados negativos do nosso teste padrão (nº de amostras negativas em ambos os testes/nº total de amostras negativas), ou seja, as 6 amostras negativas para a PCR-RT, também o foram negativas também para o teste em estudo, revelando uma especificidade de 100%.

Tabela III - Teste de diagnóstico PCR-RT/HCV Ag *core*

	GOLD STANDARD PCR-RT		TOTAL
	AMOSTRAS POSITIVAS	AMOSTRAS NEGATIVAS	
HCV Ag <i>core</i>			
Amostras Positivas	67	0	67
Amostras negativas	22	6	28
TOTAL	89	6	95

Sensibilidade 75%; Especificidade 100%

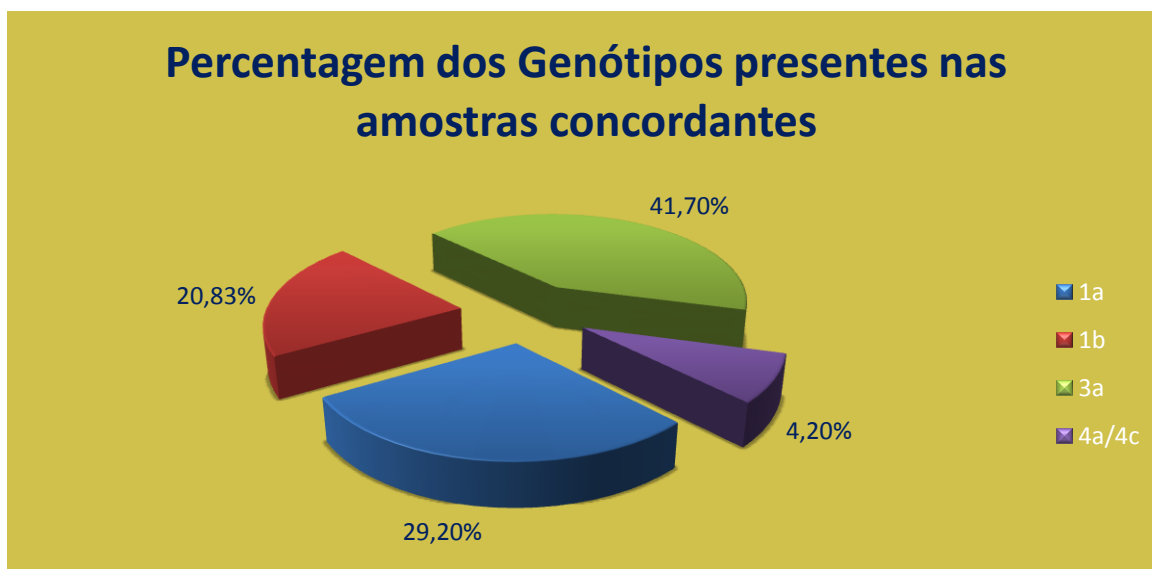
De acordo com os resultados anteriores e após o cálculo da análise da concordância, utilizando o teste Kappa de Choen entre as variáveis PCR-RT e HCV Ag *core*, verificou-se que, o grau de concordância entre as mesmas é de 0,28. De acordo com este teste, o resultado traduz um grau de concordância moderado.

Das 67 amostras positivas concordantes foi possível observar que a maioria destas apresentava carga viral superior a 50000 UI/ml (Tabela IV).

**Tabela IV - Relação das amostras concordantes com a carga viral**

Percentagem	Carga viral UI/ml
<b>10,4%</b>	<b>15-5000</b>
<b>3,0%</b>	<b>5001-10000</b>
<b>3,0%</b>	<b>10001-20000</b>
<b>6,0%</b>	<b>20001-30000</b>
<b>1,5%</b>	<b>3001-40000</b>
<b>3,0%</b>	<b>40001-50000</b>
<b>73,1%</b>	<b>50001-43868720</b>

Foi possível verificar que o genótipo predominante nas amostras concordantes foi o 3b (Figura 19).



**Figura 19 - Percentagem dos genótipos presentes nas amostras concordantes**

Das 22 amostras discordantes, positivas para a PCR-RT e negativas para o HCV Ag *core*, observou-se que a carga viral mais alta deste grupo foi de 2500 UI/ml. De acordo com a

tabela V, a percentagem maior de discrepância nestas amostras positivas correspondeu a cargas virais inferiores a 100 UI/ml.

Tabela V - Relação das amostras discrepantes com a carga viral

<i>Percentagem</i>	<i>Carga viral UI/ml</i>
<b>38.1%</b>	<b>&lt;100</b>
<b>19.0%</b>	<b>100-200</b>
<b>9.5%</b>	<b>201-300</b>
<b>4.8%</b>	<b>401-500</b>
<b>9.5%</b>	<b>601-700</b>
<b>4.8%</b>	<b>701-800</b>
<b>4.8%</b>	<b>901-1000</b>
<b>9.5%</b>	<b>1001-2500</b>

Verificou-se que a maioria das amostras com resultados discrepantes entre as duas variáveis, pertencia ao genótipo 1a (Figura 20)

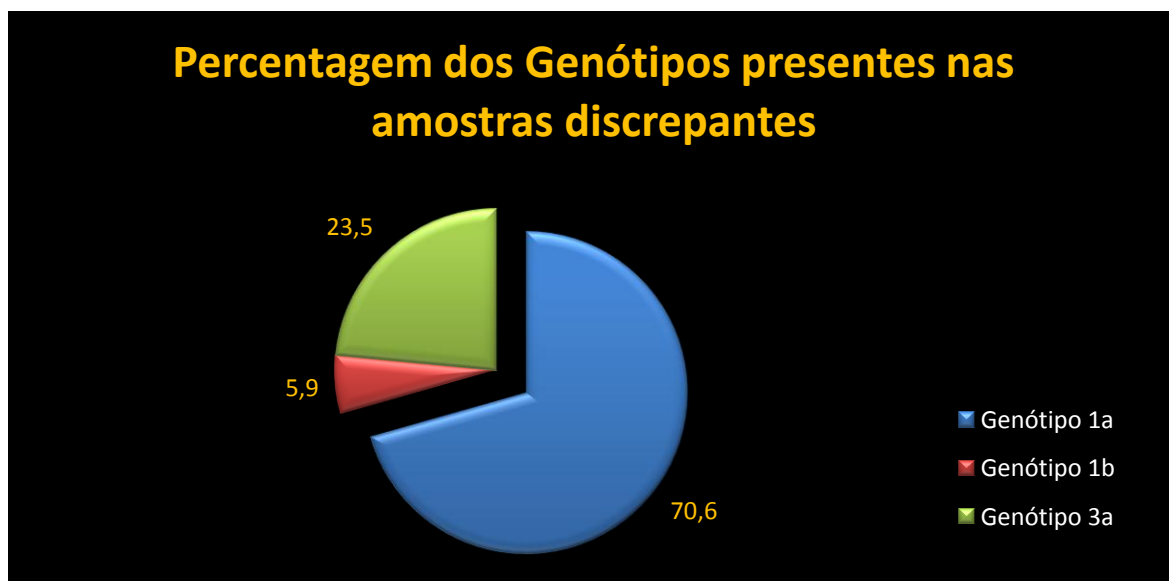


Figura 20 - Percentagem dos genótipos presentes nas amostras discrepantes

No grupo controlo de 10 amostras negativas para a PCR-RT utilizado na avaliação da especificidade do teste problema, obtiveram-se resultados negativos para a pesquisa do antígeno do *core* do VHC, correspondendo a uma especificidade de 100% (Figura 21)

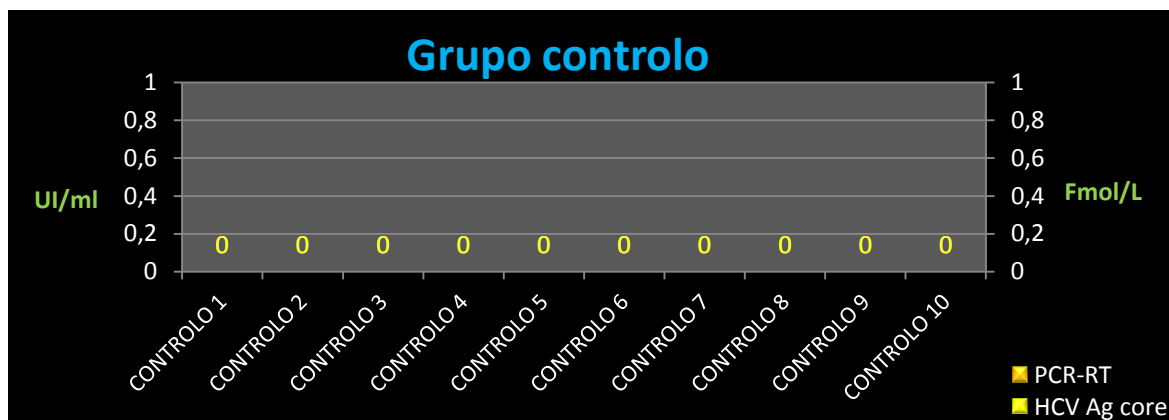


Figura 21 - Resultados do grupo controlo

Da análise estatística da correlação entre variáveis não paramétricas utilizando o teste estatístico de Spearman, comparando em primeiro lugar as variáveis PCR-RT e HCV Ag *core* na generalidade no estudo, obteve-se o seguinte resultado (Figura 22):

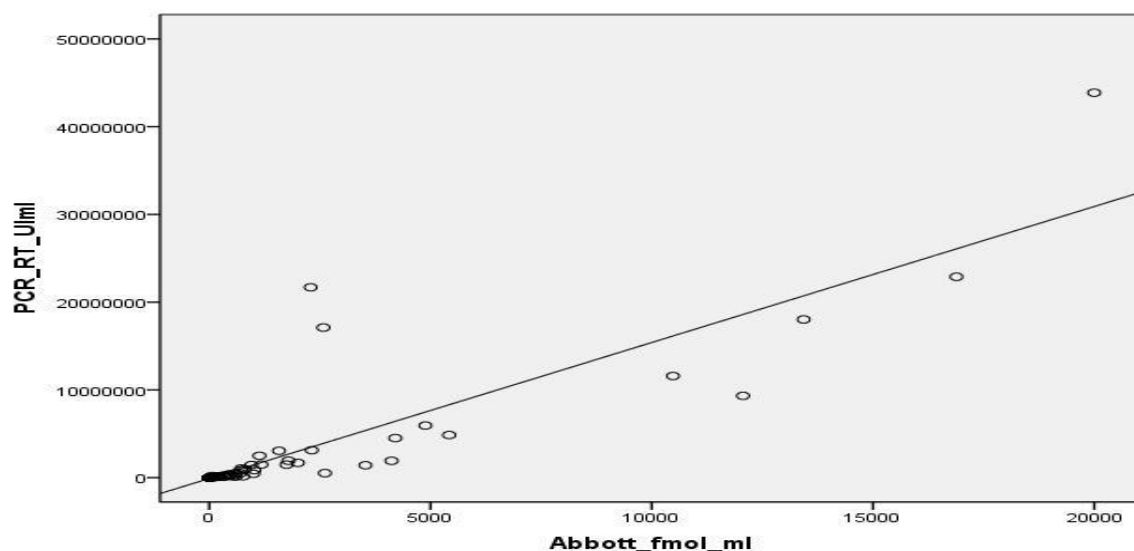


Figura 22 - Correlação de Spearman de todos os resultados da PCR-RT com os do HCV Ag *core*.  $\rho=0,971$ ,  $p<0,001$ ,  $n=95$

Foram efetuadas também as correlações da PCR-RT com o HCV Ag *core* nos 3 momentos do decorrer do processo terapêutico, ou seja, cronologicamente correlacionou-se as amostras nº1 da PCR-RT com as amostras nº1 do HCV Ag *core*, fazendo o mesmo para as 2<sup>as</sup> e 3<sup>as</sup> amostras, de modo a perceber qual é a evolução dos resultados do teste problema por comparação com a técnica de referência, ao longo do tratamento dos doentes estudados. Assim, obtiveram-se as seguintes correlações das amostras nº 1 (Figura 23 e 24), das amostras nº 2 (Figura 25 e 26) e das amostras nº 3 (figura 27 e 28) respetivamente:

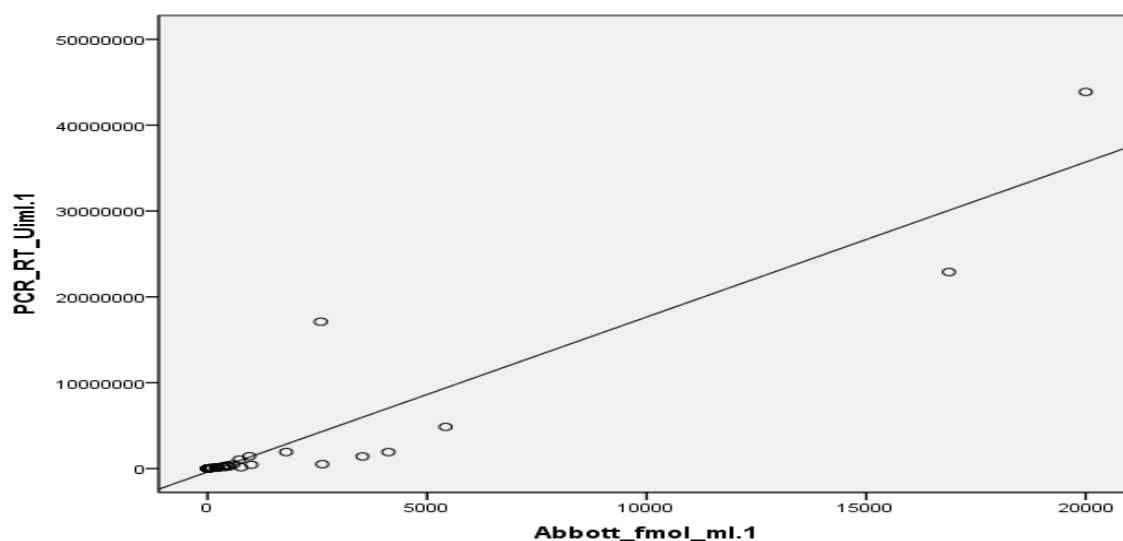


Figura 23 - Correlação de Spearman das amostras nº 1 da PCR-RT com HCV Ag *core*.  $\rho=0,977$ ,  $p<0,001$ ,  $n=41$

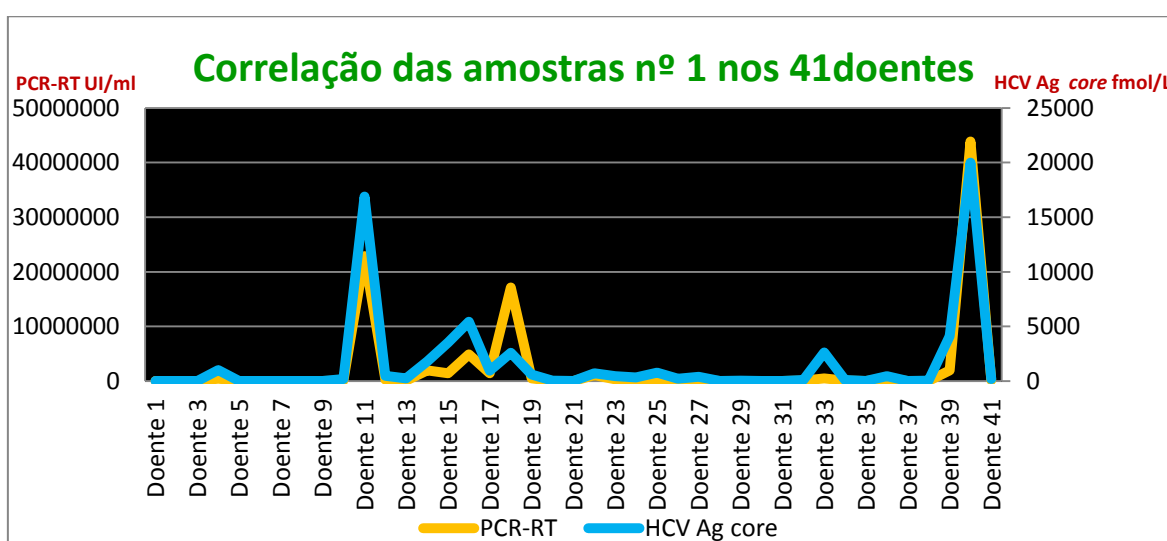


Figura 24 - Correlação das amostras nº 1 da PCR-RT com HCV Ag *core*



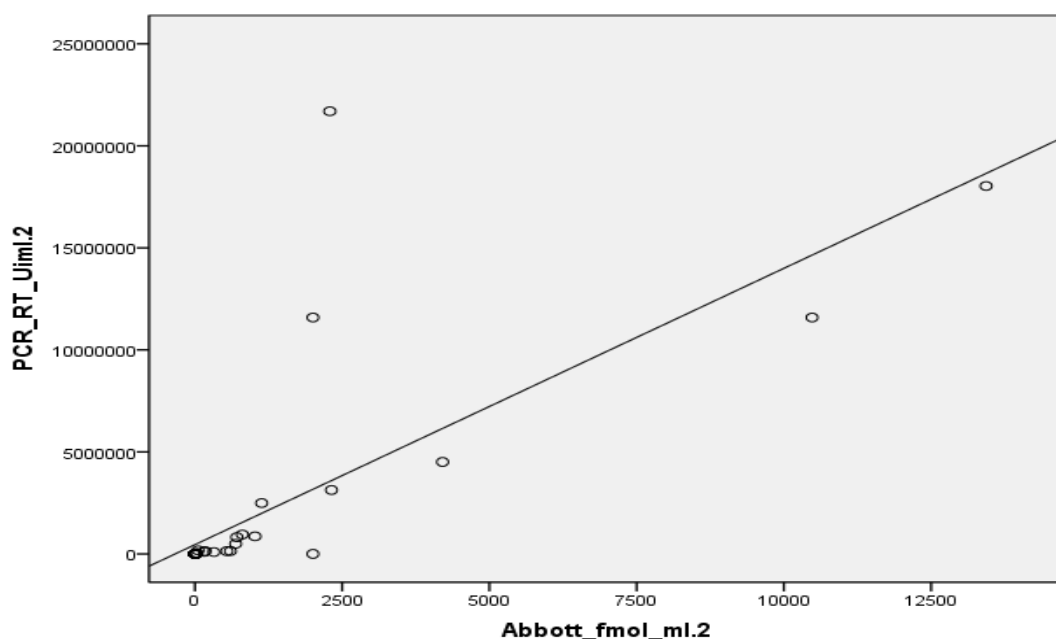


Figura 25 - Correlação de Spearman das amostras nº 2 da PCR-RT com HCV Ag *core*.  $\rho=0,909$ ,  $p<0,001$ ,  $n=41$

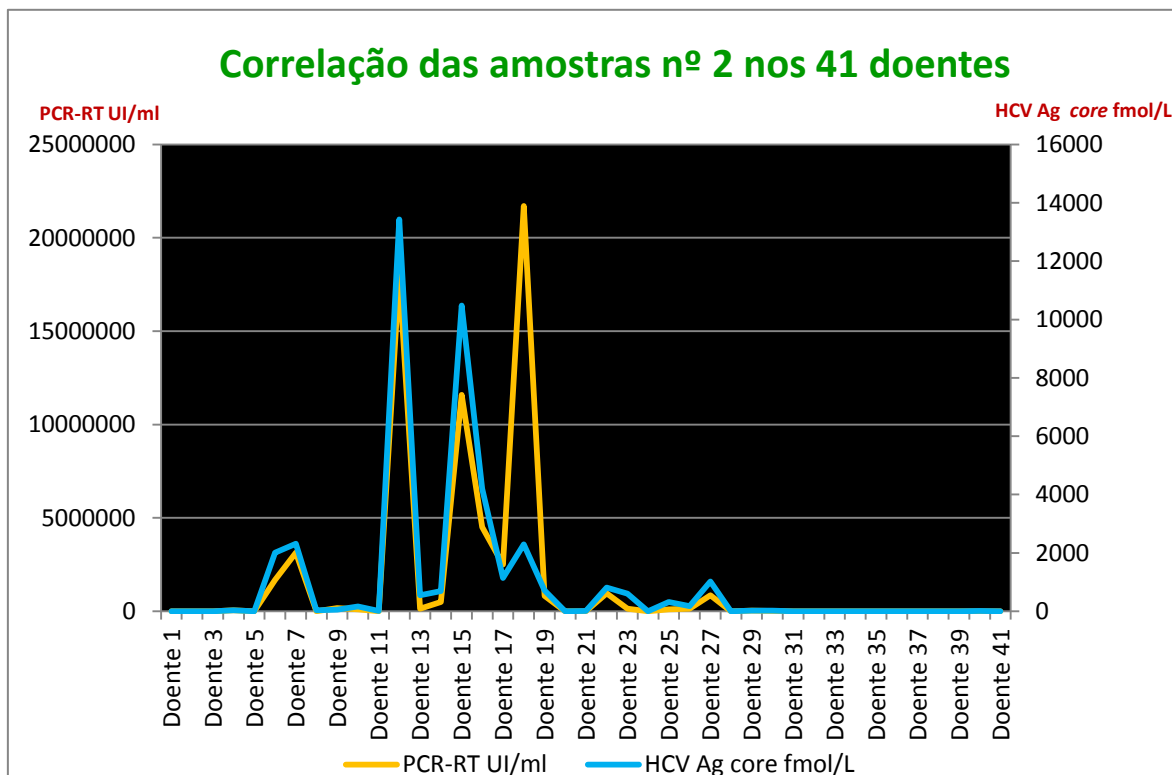


Figura 26 - Correlação das amostras nº 2 da PCR-RT com HCV Ag *core*

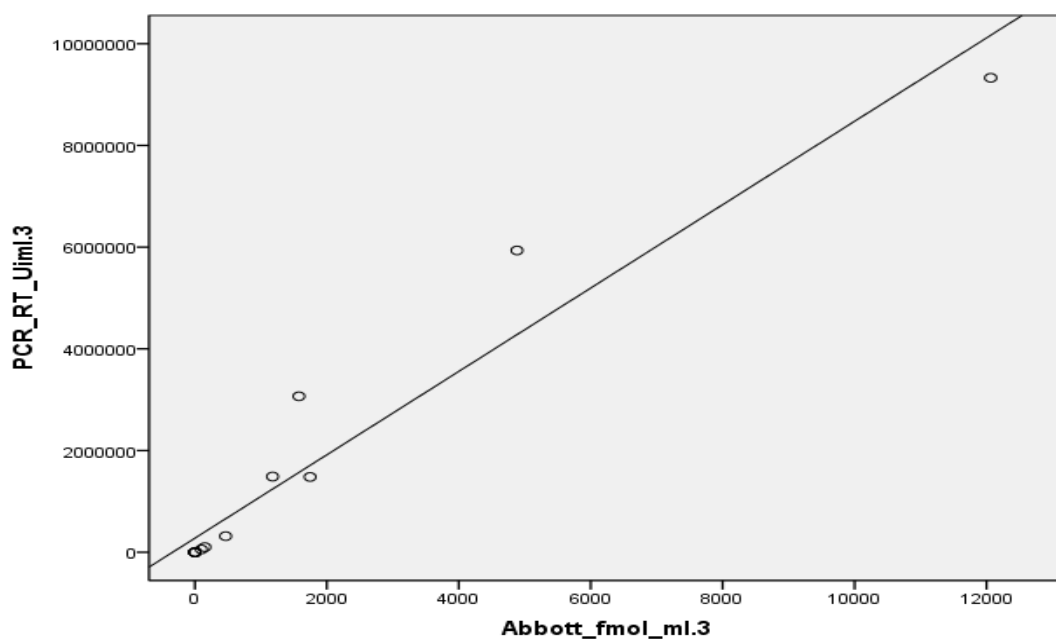


Figura 27 - Correlação de Spearman das amostras nº 3 da PCR-RT com HCV Ag *core*.  $\rho=0,922$ ,  $p<0,001$ ,  $n=13$

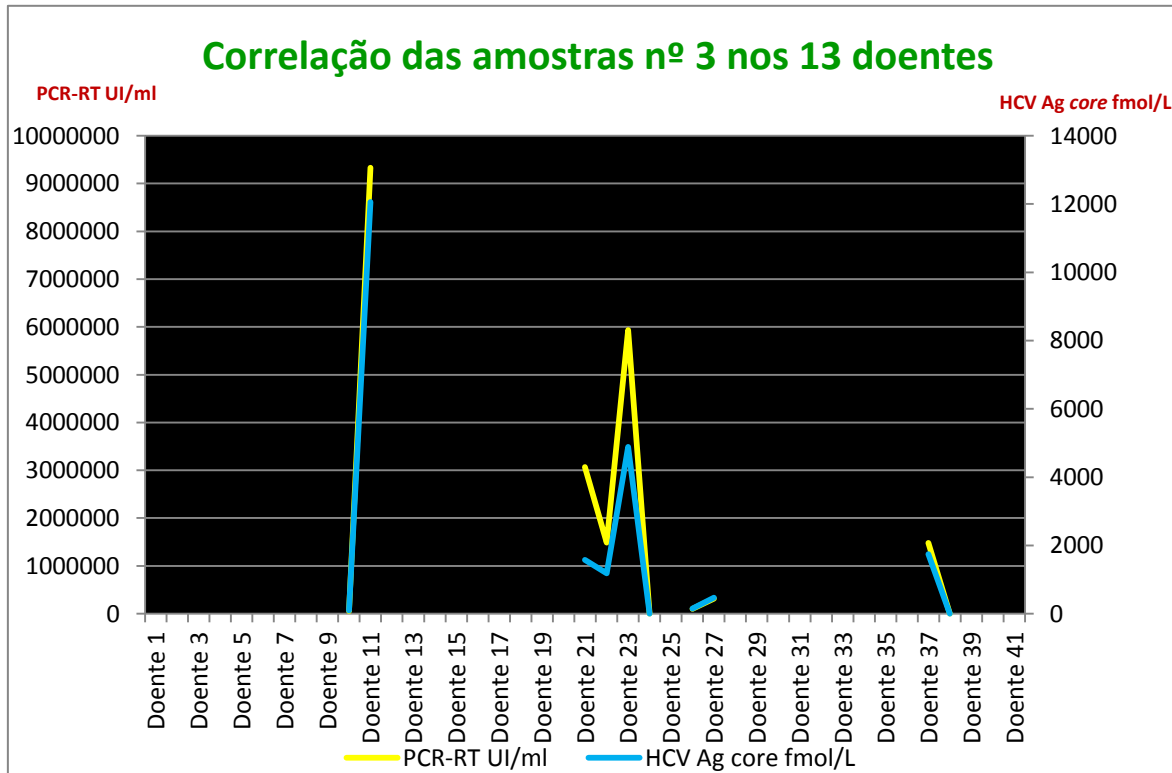


Figura 28 - Correlação das amostras nº 3 da PCR-RT com HCV Ag *core*

A comparação dos resultados da PCR-RT e o HCV Ag *core* nas várias amostras de cada doente, é apresentada nas seguintes figuras (Figuras 29-69):

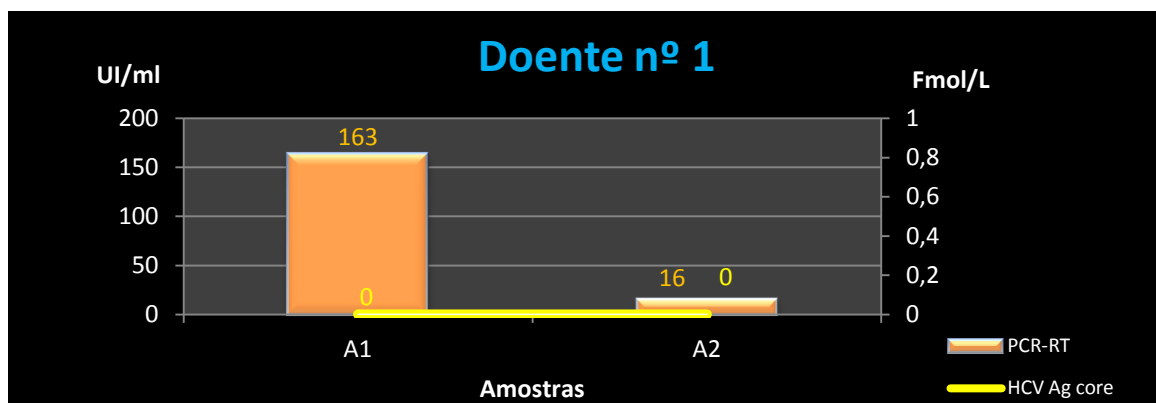


Figura 29 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag *core* no doente 1

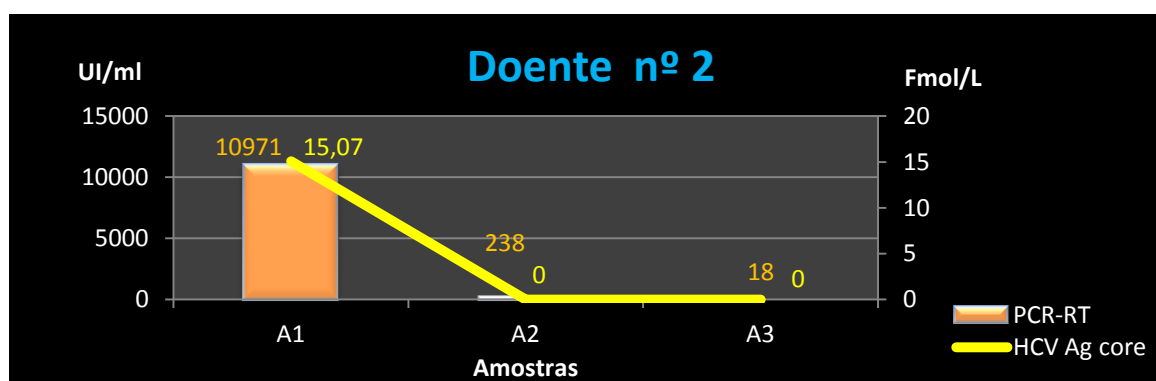


Figura 30 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag *core* do doente 2

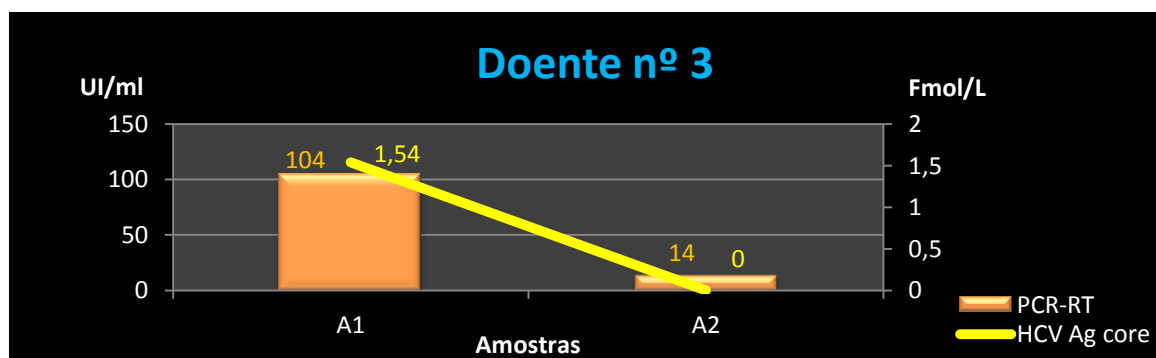


Figura 31 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag *core* no doente 3

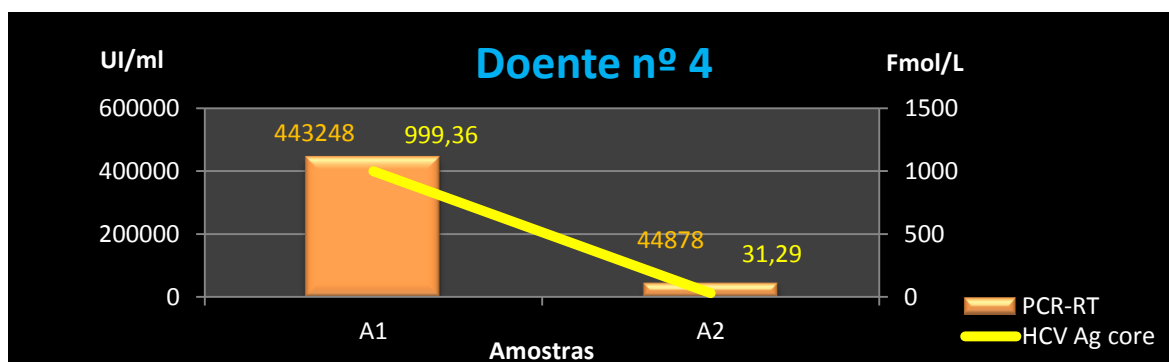


Figura 32 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core no doente 4

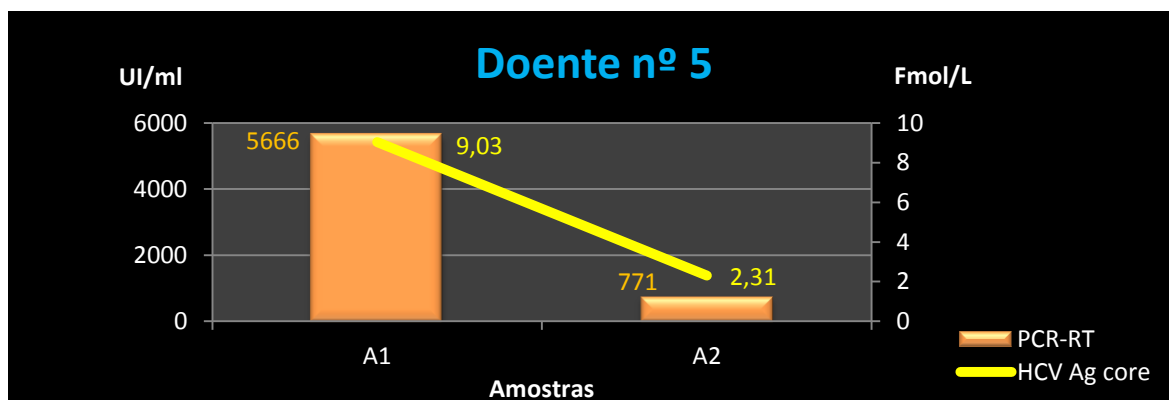


Figura 33 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core no doente 5

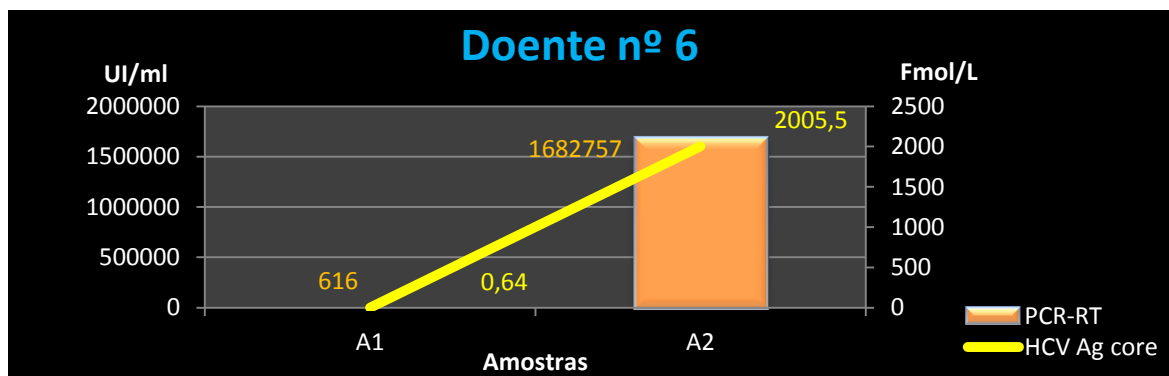


Figura 34 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 6

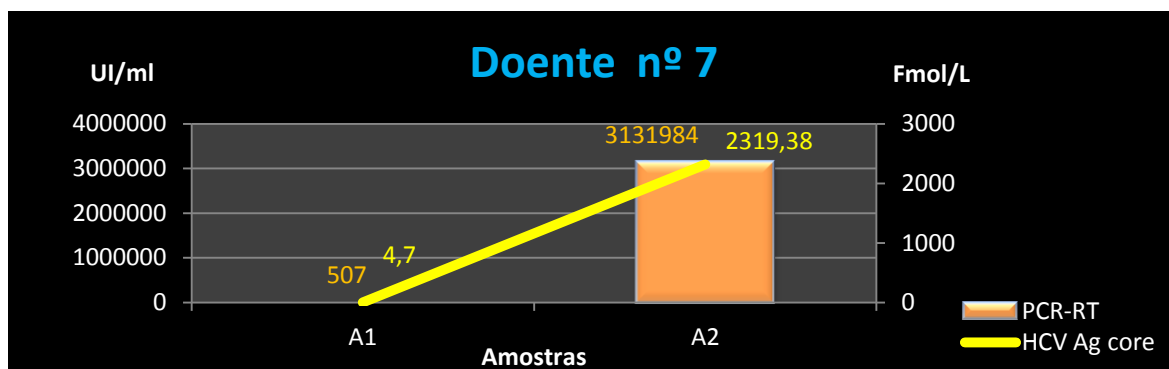


Figura 35 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 7

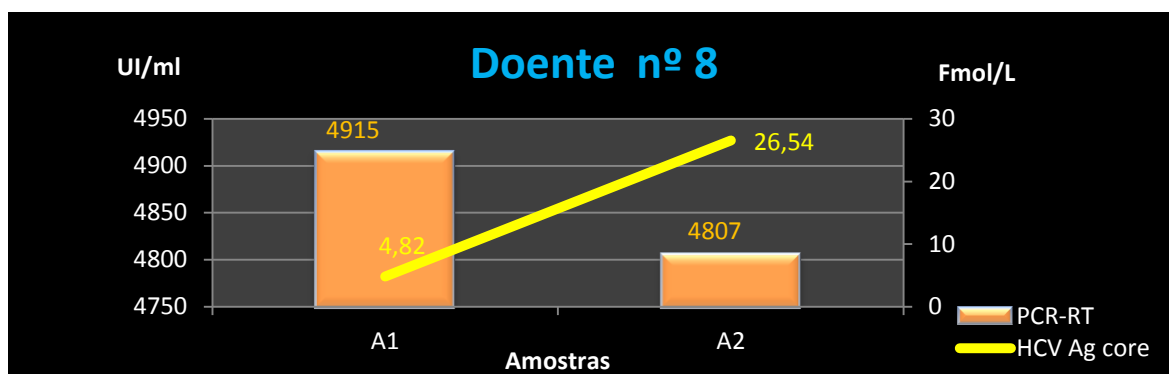


Figura 36 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 8

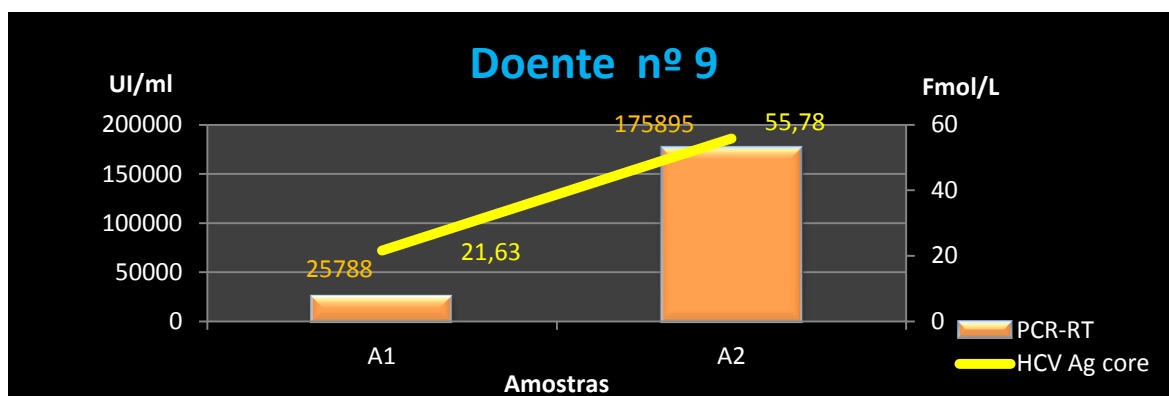


Figura 37 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 9

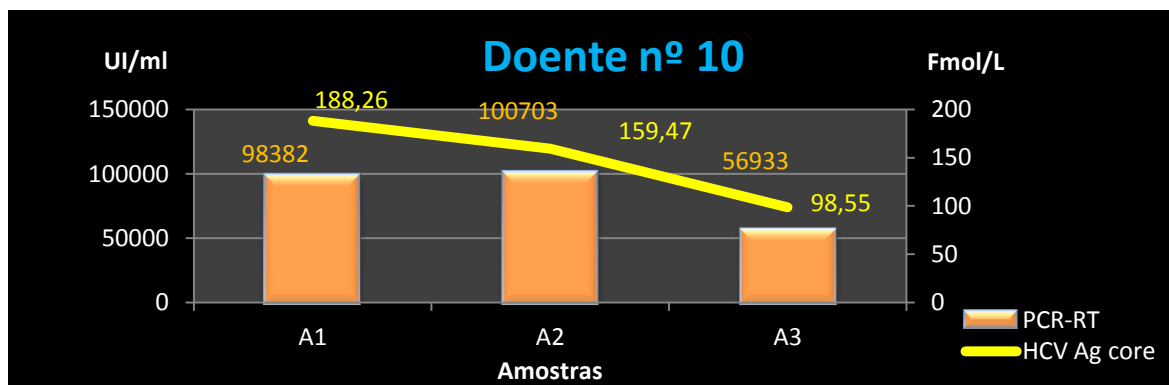


Figura 38 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 10

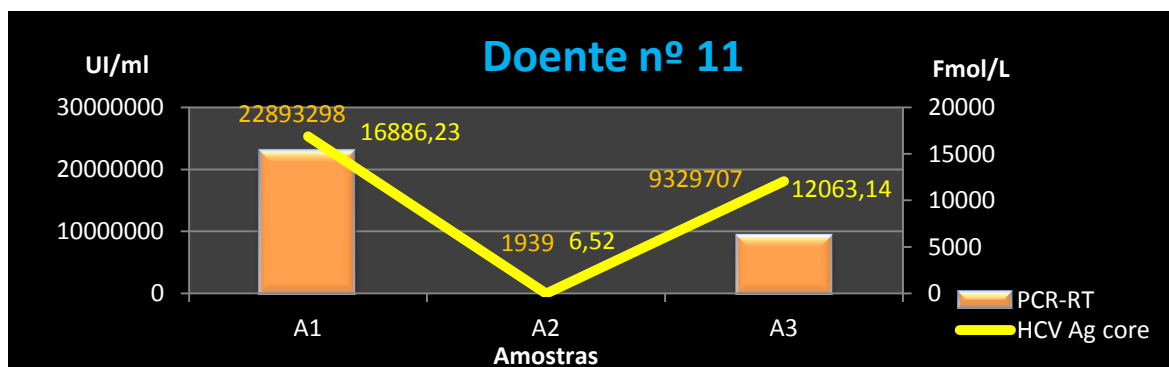


Figura 39 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 11

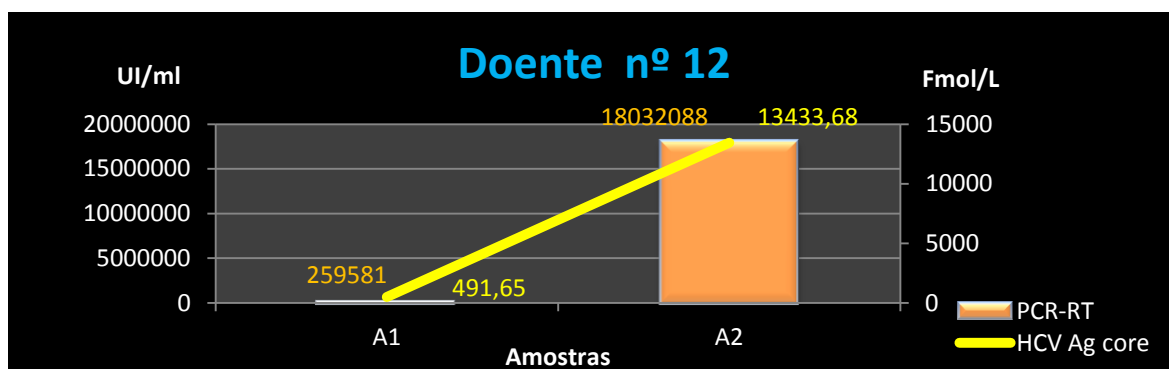


Figura 40 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag *core* do doente 12

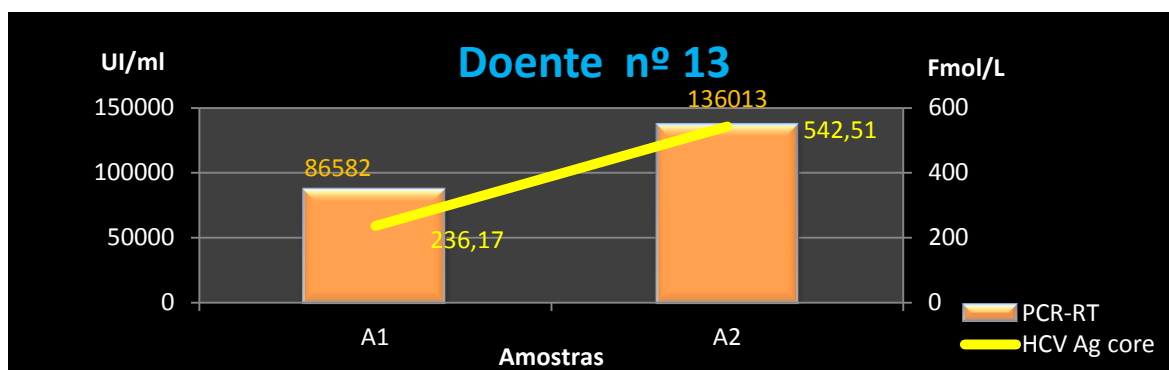


Figura 41 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag *core* do doente 13

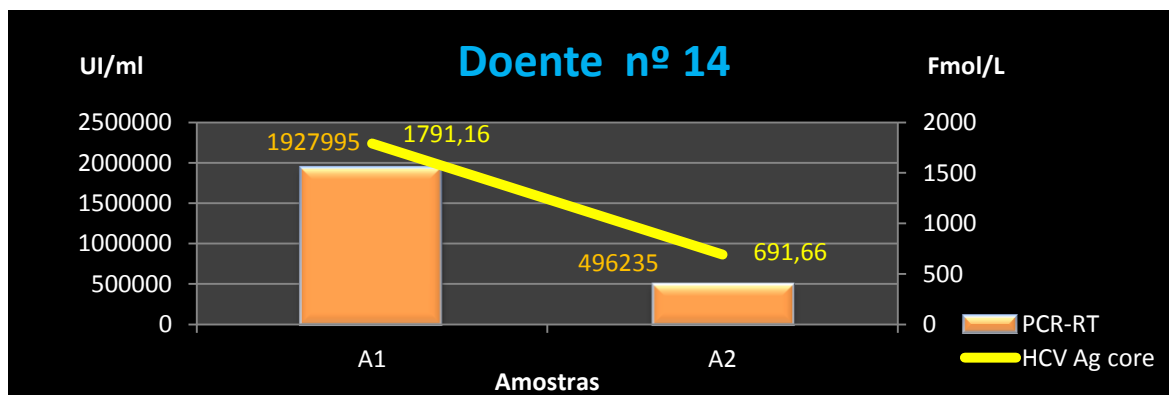


Figura 42 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag *core* do doente 14

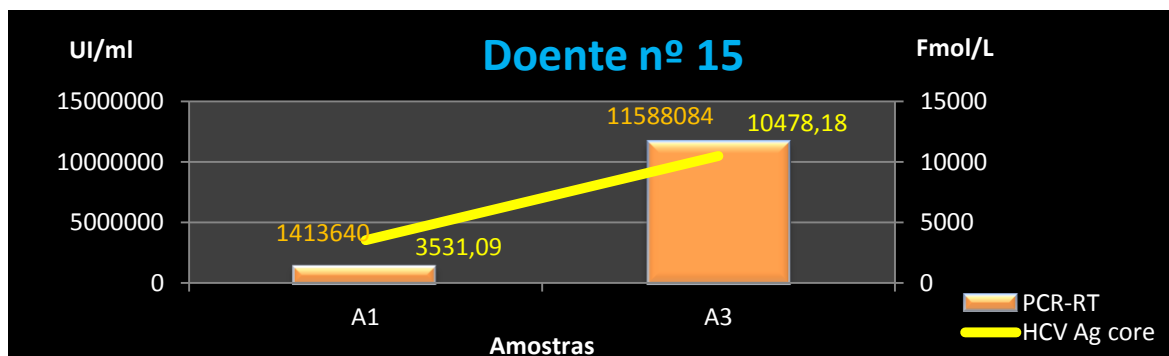


Figura 43 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag *core* do doente 15

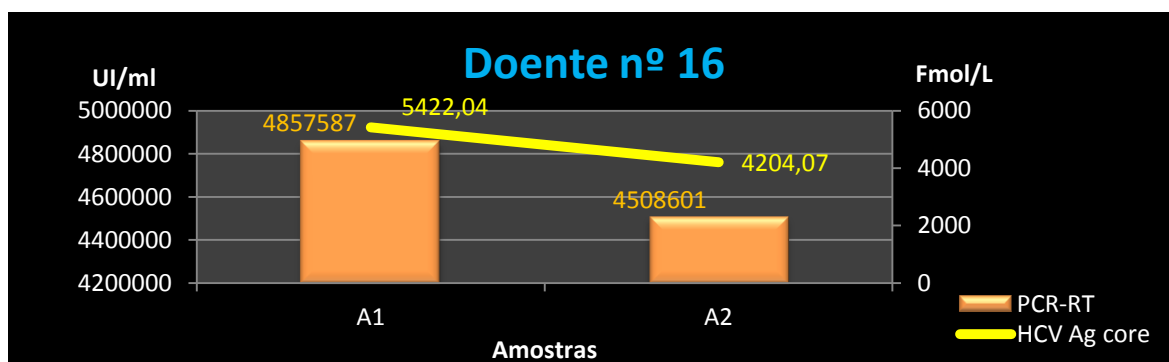


Figura 44 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 16

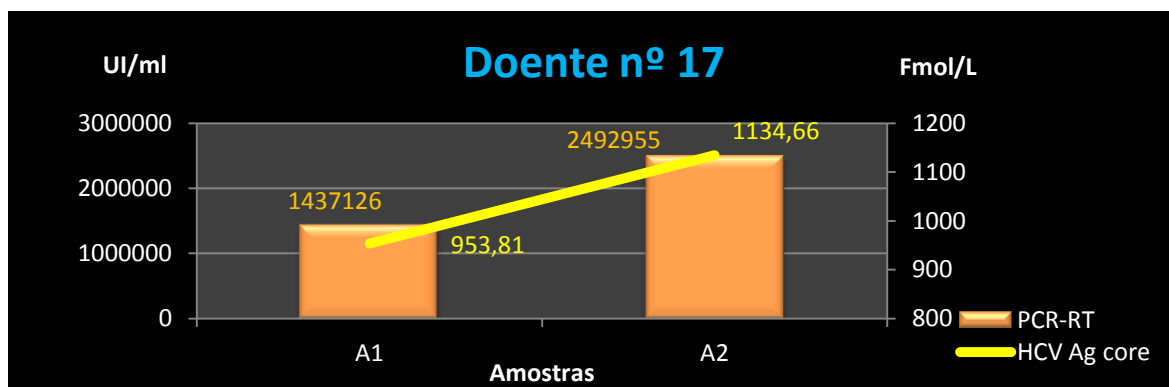


Figura 45 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 17

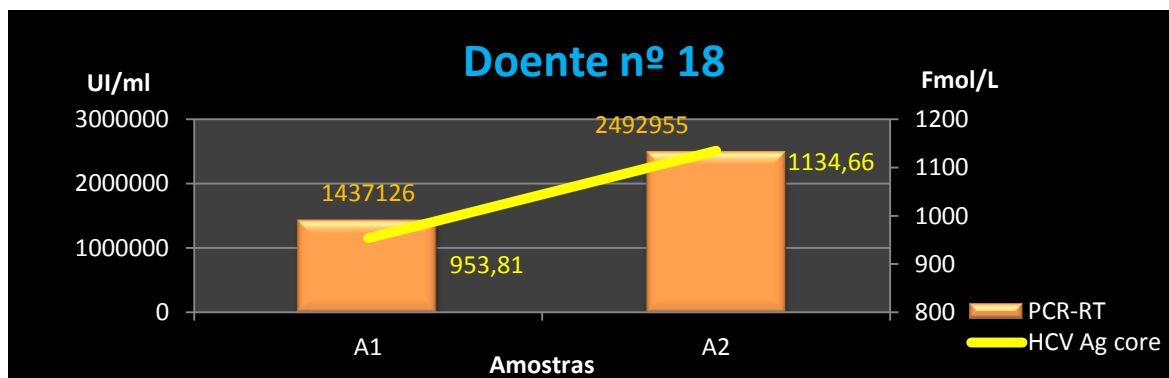


Figura 46 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 18

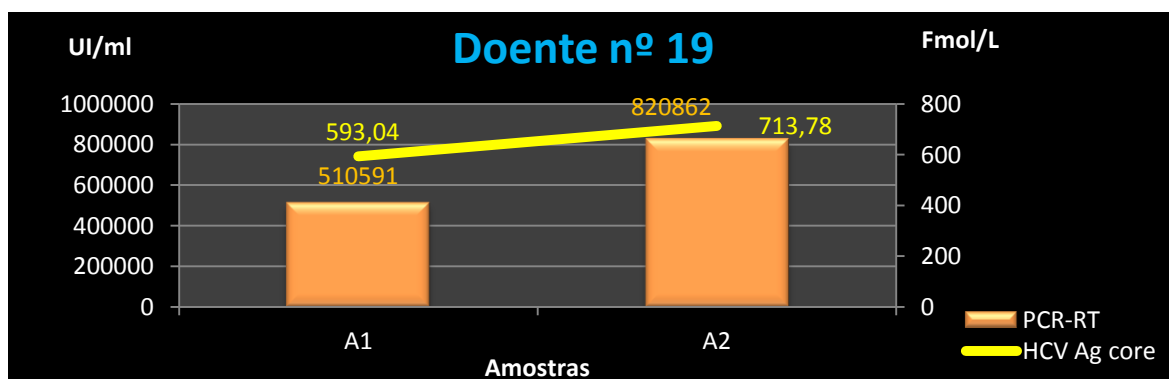


Figura 47 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 19

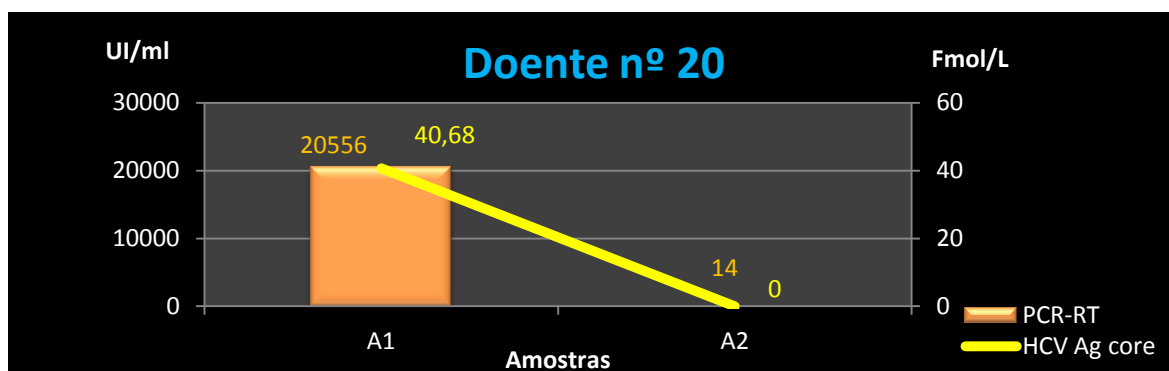


Figura 48 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag *core* do doente 20

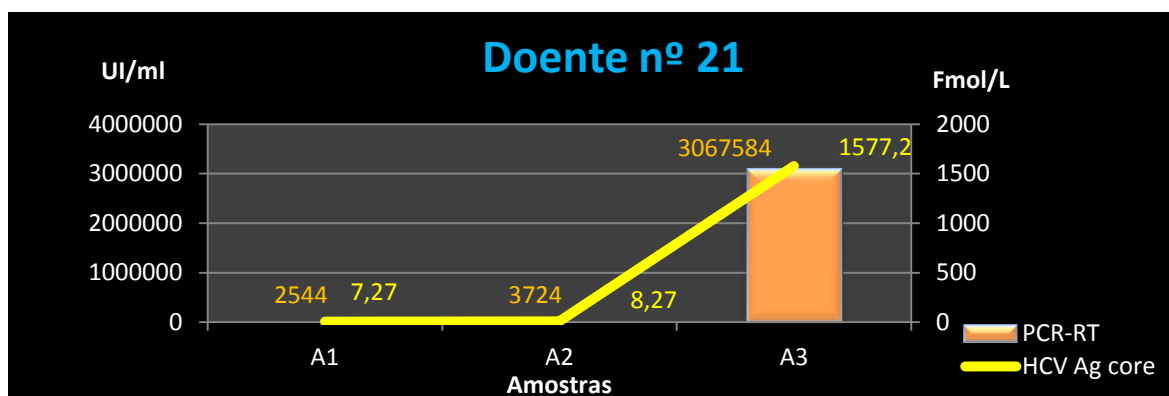


Figura 49 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag *core* do doente 21

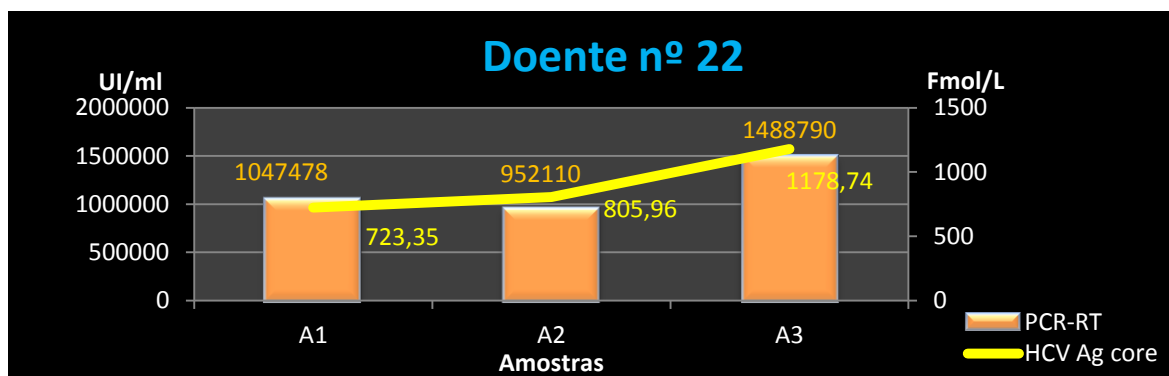


Figura 50 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag *core* do doente 22

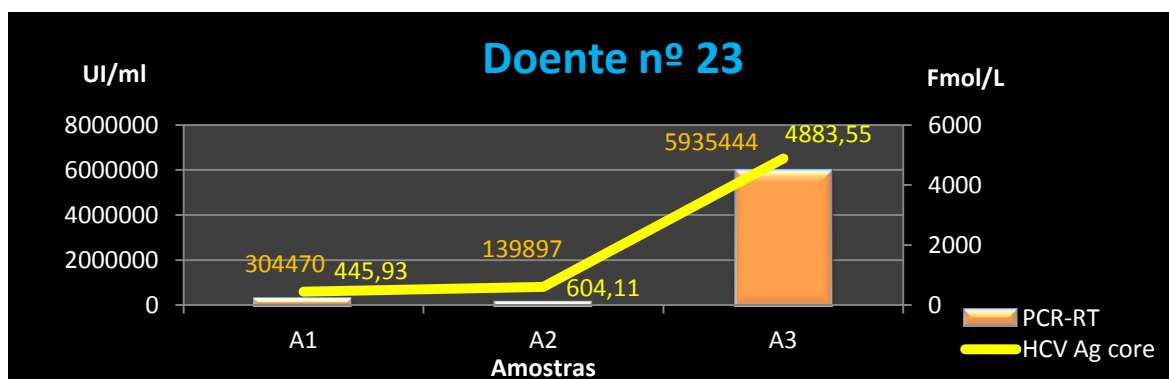


Figura 51 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag *core* do doente 23



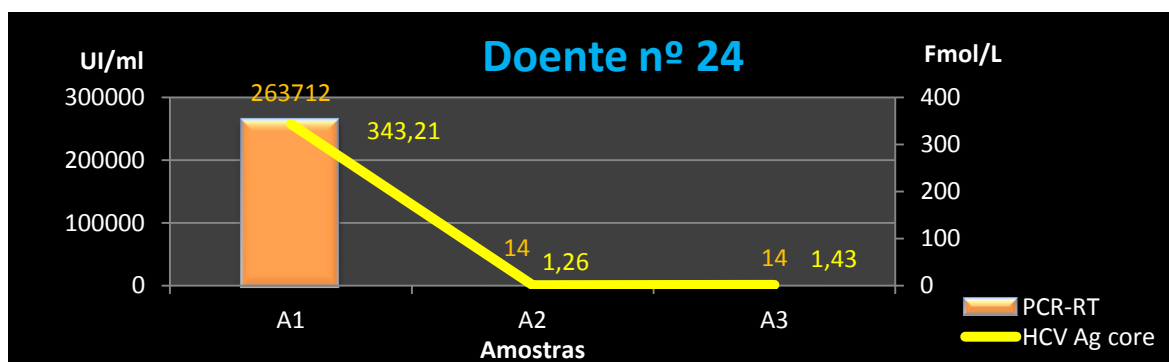


Figura 52 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 24

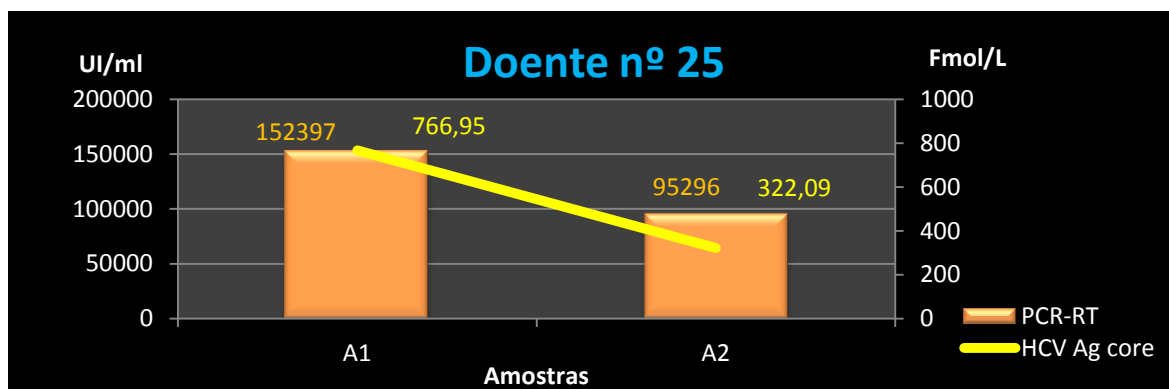


Figura 53 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 25

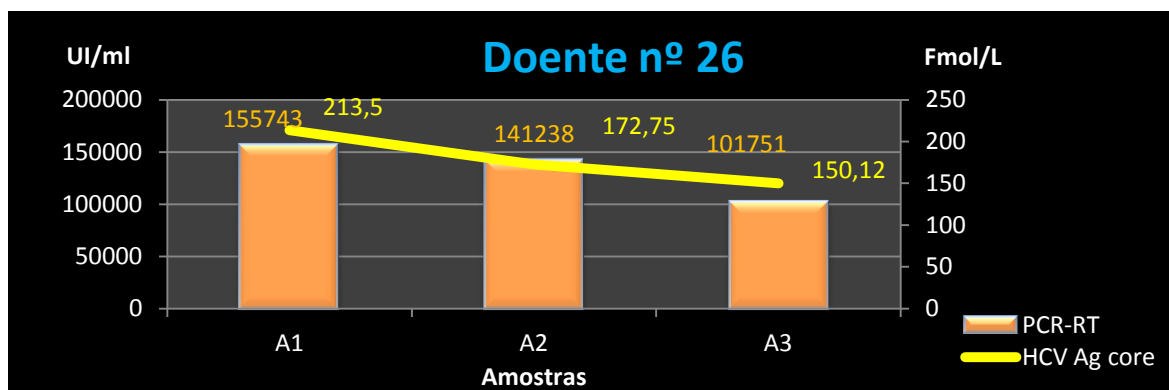


Figura 54 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 26

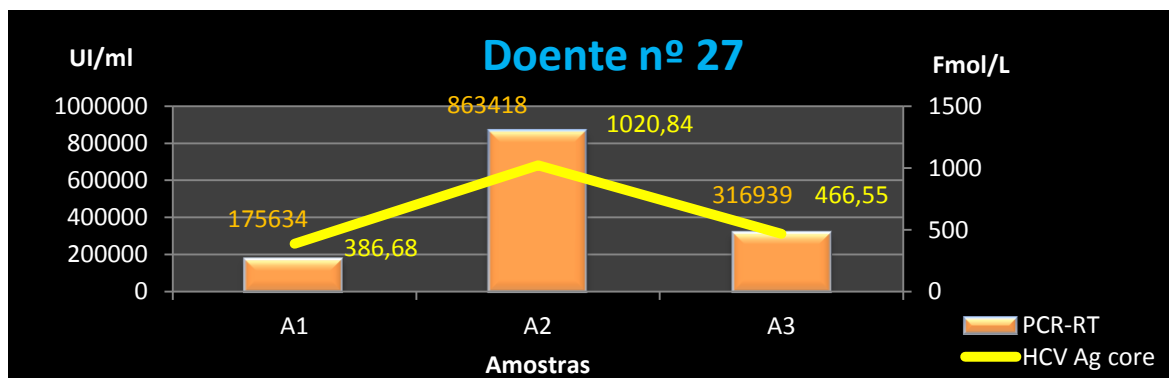


Figura 55 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 27

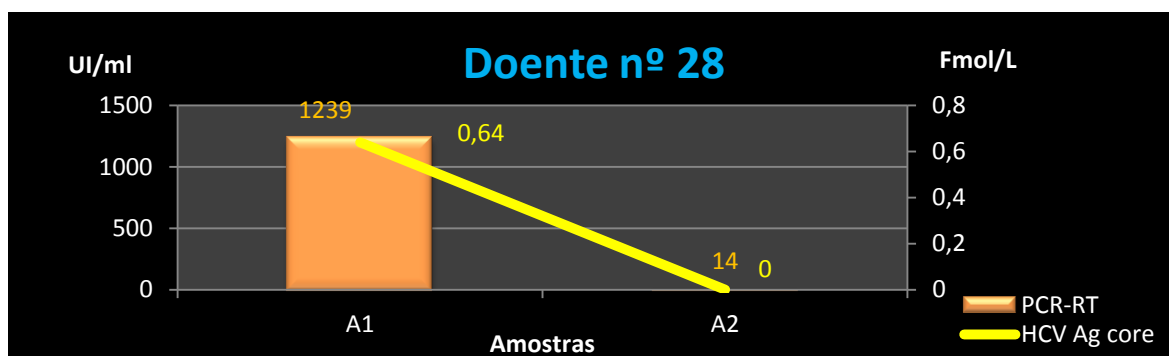


Figura 56 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 28

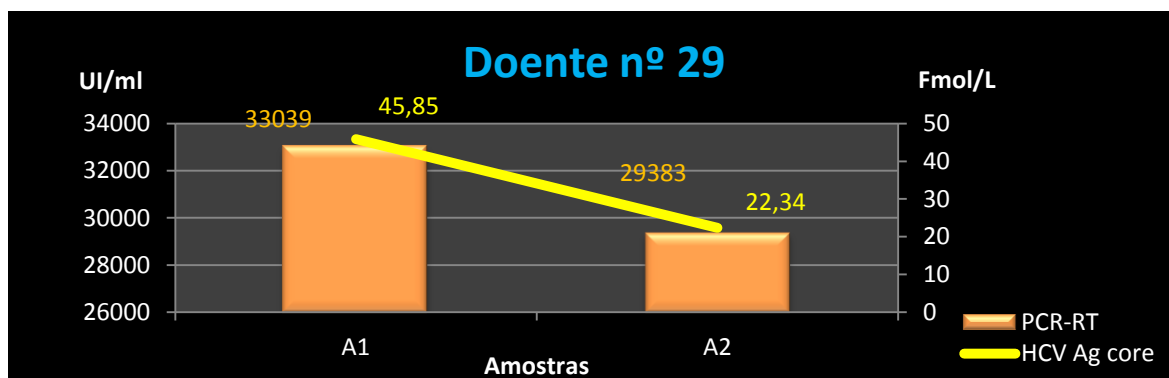


Figura 57 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 29

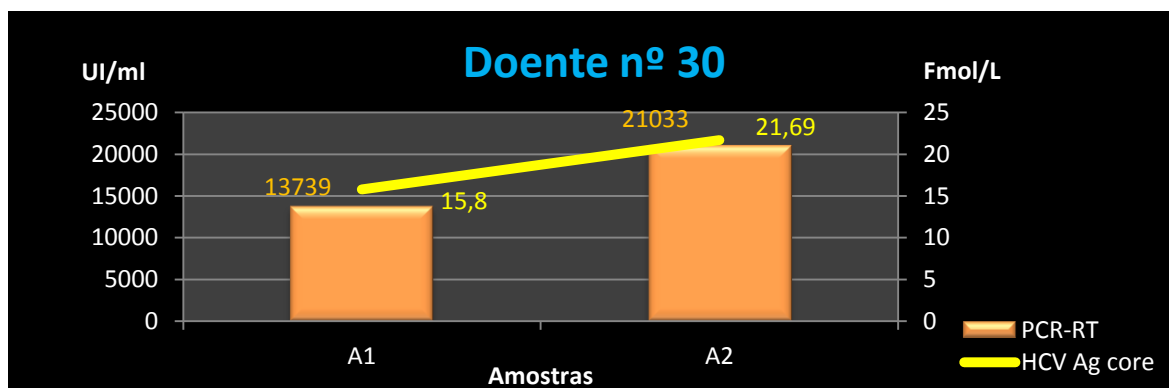


Figura 58 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 30

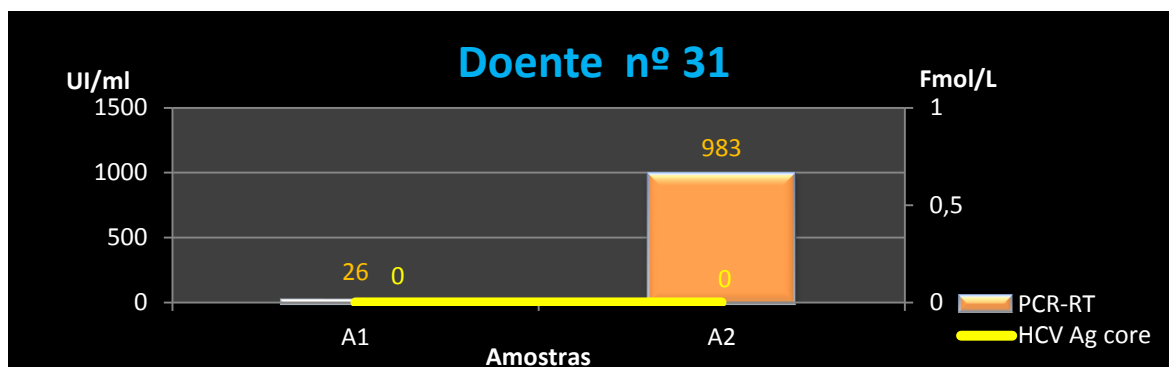


Figura 59 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 31

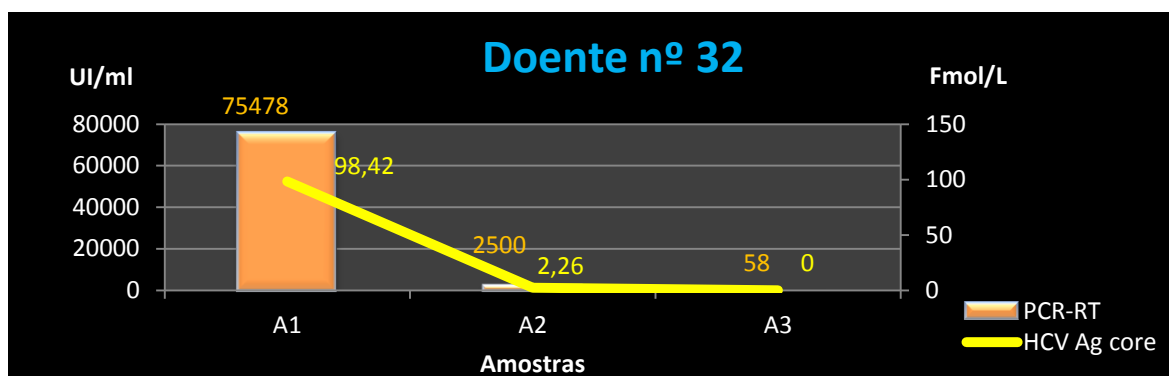


Figura 60 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 32

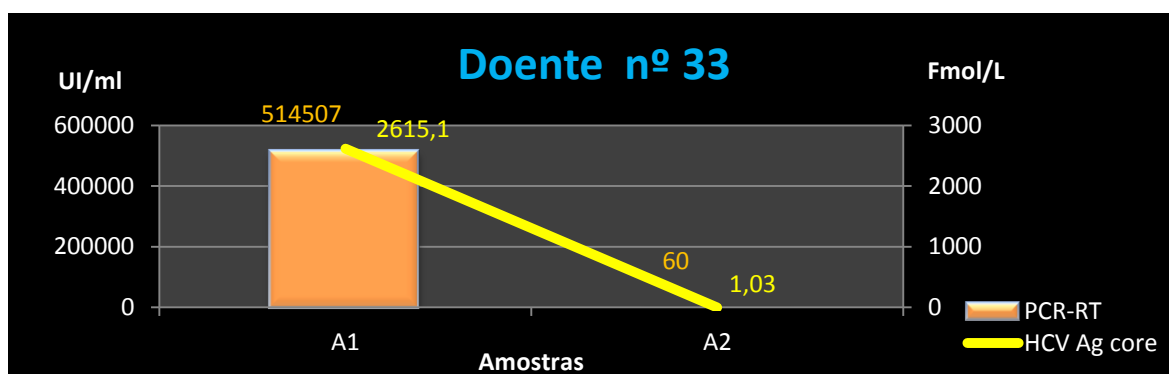


Figura 61 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 33

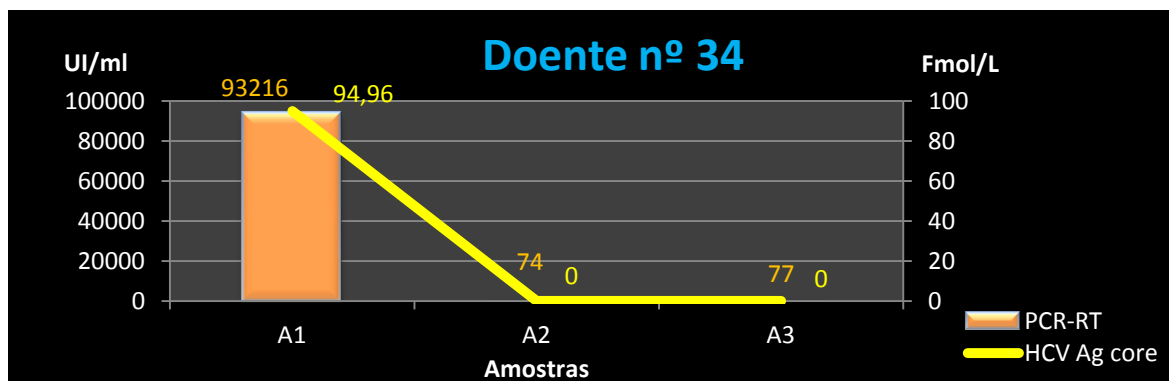


Figura 62 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 34

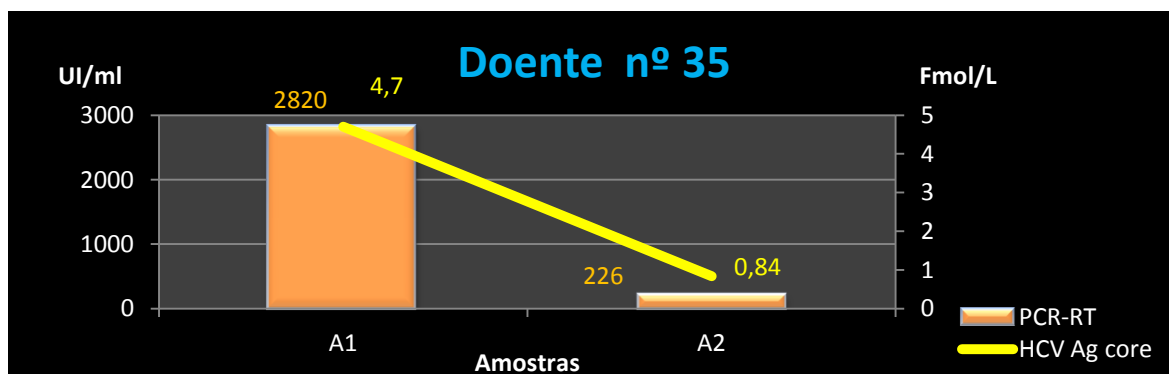


Figura 63 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 35

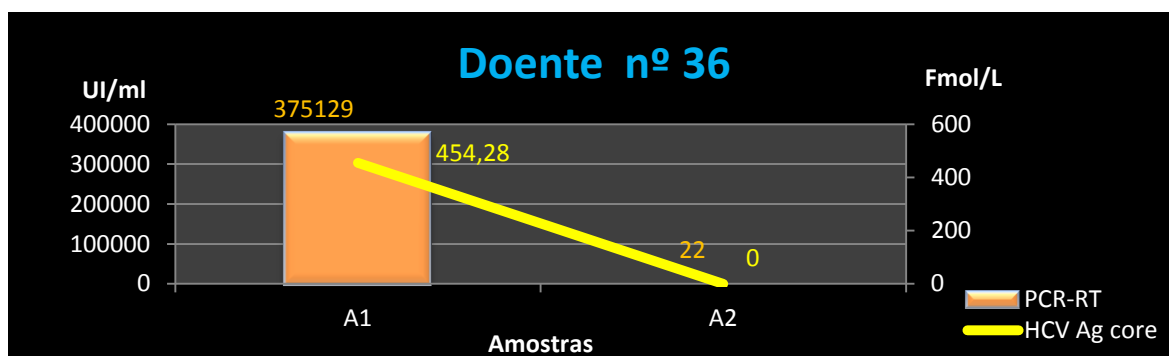


Figura 64 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 36

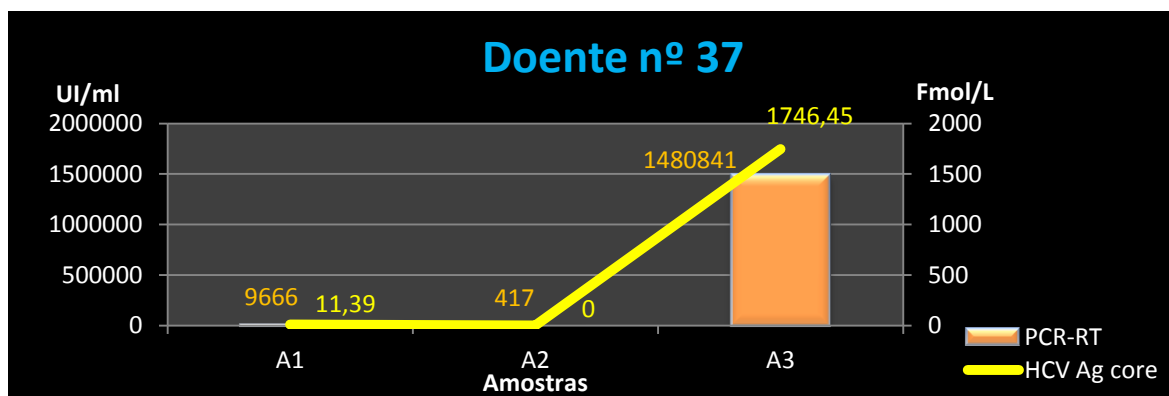


Figura 65 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 37

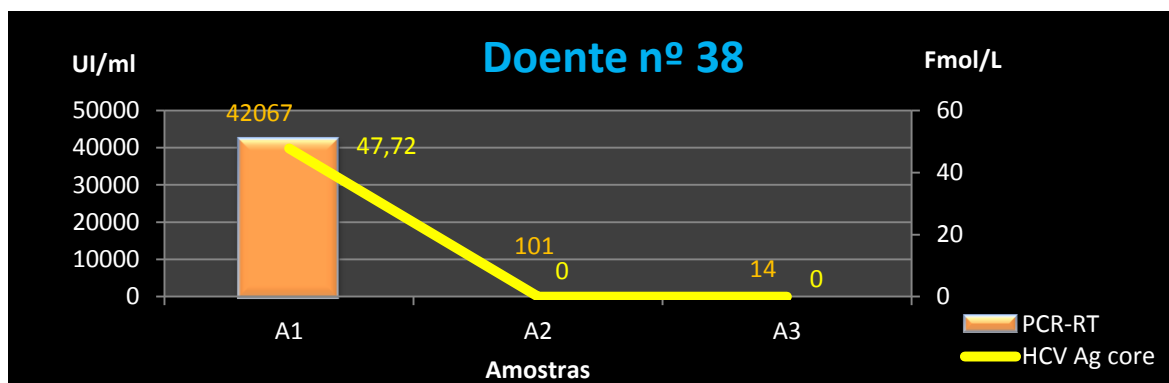


Figura 66 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 38

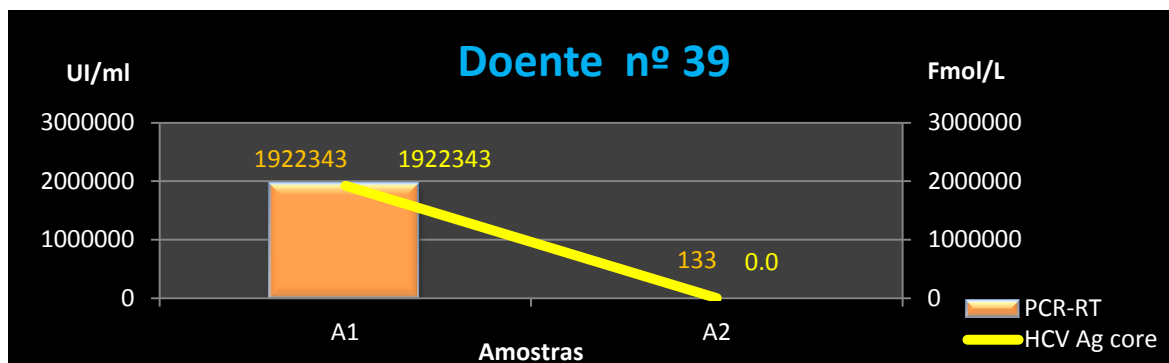


Figura 67 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag core do doente 39

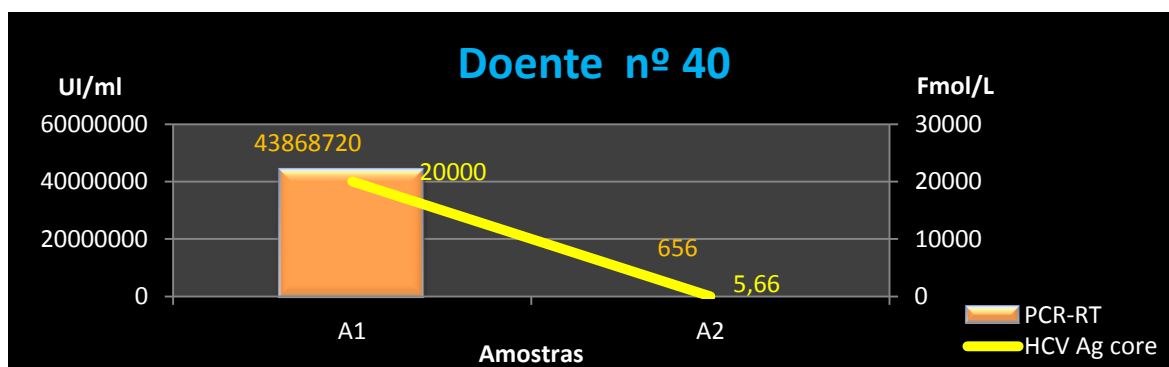


Figura 68 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag *core* do doente 40

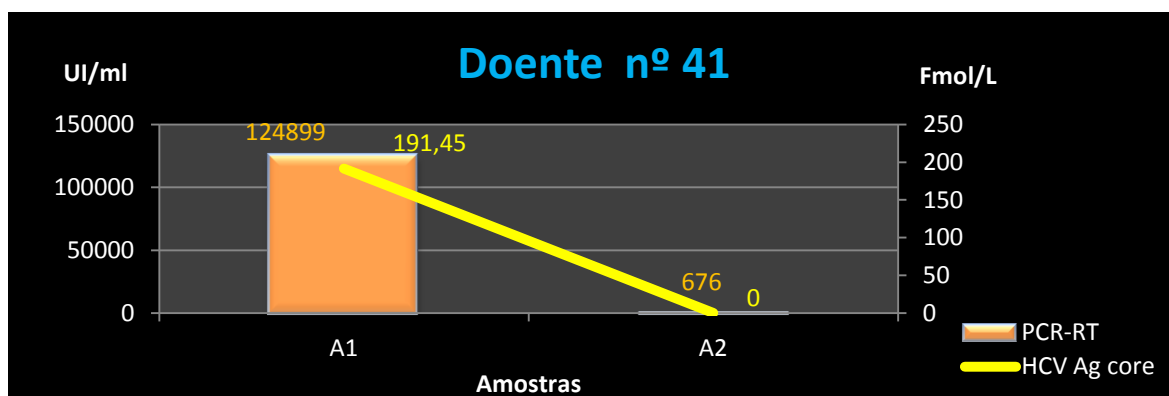


Figura 69 - Apresentação gráfica dos resultados da PCR-RT e HCV Ag *core* do doente 41

De seguida são apresentados os resultados dos genótipos dos 41 doentes (Figura 70 à Figura 73):



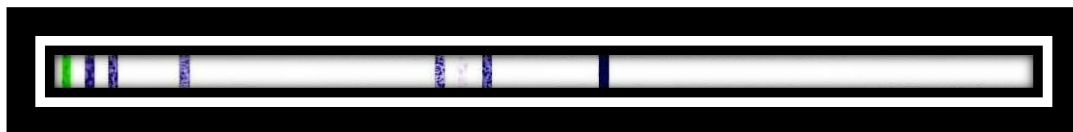
Figura 70 - Genótipo 1a referente aos doentes nº 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 15, 16, 20, 25, 26, 28, 31, 32, 34, 35, 37 e 41



Figura 71 - Genótipo 1b referente aos doentes nº 6, 12, 18, 19, 27 e 40



Figura 72 - Genótipo 3a referente aos doentes nº 4, 11, 13, 14, 17, 21, 23, 24, 29, 30, 33, 36, 38 e 39



**Figura 73 - Genótipo 4c/4d referente aos doentes nº 8 e 22**

## 2. Discussão

Atualmente, o diagnóstico de infecção por hepatite C é feito com base na pesquisa de anticorpos contra o vírus, utilizando-se testes altamente sensíveis e específicos, como por exemplo, o HCV Ac Abbott® e o HCV Ag/Ab Ultra BIO-RAD®. A “confirmação” da presença destes mesmos anticorpos é feita por testes mais específicos (RIBA III - Chiron®, INNO-LIA™ HCV Ab III - Innogenetics®), efetuando-se por último a quantificação da carga viral por uma técnica de PCR, de elevada sensibilidade e especificidade (35, 52, 57) como por exemplo, a PCR-RT (Roche®). O aparecimento no mercado de testes de quantificação do antígeno do *core* do VHC veio abrir novas perspectivas no diagnóstico de replicação viral ativa e na monitorização de doentes em tratamento, permitindo também obter um resultado rápido e fiável em situações de urgência (5, 35, 51-53, 57-58, 60).

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar um destes novos testes de diagnóstico de infecção ativa, a pesquisa do antígeno do *core* do vírus da hepatite C da Abbott® Diagnostics®, usando como método de referência a quantificação da carga viral por PCR em tempo real, utilizando o teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV.

Apesar da amostragem utilizada ter sido limitada em termos do número de amostras utilizado, os dados obtidos sugerem que: [1] a quantificação do antígeno do *core* do VHC pode ser utilizada para o seguimento de doentes a fazer tratamento para a infecção pelo VHC com cargas virais acima de 2500 UI/ml; [2] o teste HCV Ag *core* pode ser usado em simultâneo com a pesquisa do anticorpo para o VHC em situações de urgência onde é necessário diagnosticar com rapidez a possibilidade de infecção viral ativa por VHC; [3] a avaliação do tipo de genótipo presente nos doentes em estudo demonstrou não haver evidência científica de que este pode influenciar o resultado do teste HCV Ag *core*; [4] em termos epidemiológicos, o estudo foi ao encontro de bibliografia anteriormente publicada, evidenciando: o sexo masculino como o mais afetado, a faixa etária dos 41 aos 50 anos como a de maior prevalência.

A quantificação do antígeno do *core* do VHC pelo teste HCV Ag *core* pode ser uma alternativa à técnica de PCR-RT em doentes com carga viral superior a 2500 UI/ml. De

facto, obteve-se uma boa correlação entre as duas metodologias ( $p=0,97$ ;  $p<0,001$ ), encontrando-se de acordo com resultados obtidos em estudos anteriores (51, 53, 67). As correlações das amostras nº 1 ( $p=0,97$ ;  $p<0,001$ ), das amostras nº 2 ( $p=0,90$ ;  $p<0,001$ ) e das amostras nº 3 ( $p=0,92$ ;  $p<0,001$ ) entre a quantificação do antígeno do *core* do VHC e a técnica de referência (PCR-RT) foram também elevadas. Para as amostras com carga viral baixa, porém, esta tendência não foi verificada, traduzindo-se numa baixa sensibilidade do teste HCV Ag *core*.

Em 22 amostras, a pesquisa do antígeno do *core* do VHC foi negativa tendo sido no entanto positiva na deteção por PCR-RT (67/89), traduzindo uma sensibilidade de 75%, o que está de acordo com o estudo de Ergunay *et al.* (51) mas diferente de outros estudos publicados (22, 67-68). No que diz respeito à especificidade (100%), o resultado está de acordo com bibliografia publicada (53, 55) mostrando que, resulta da ausência de falsos positivos (67-68).

A análise da carga viral das 22 amostras discrepantes mostrou que, 38,1% eram inferiores a 100 UI/ml e que nas restantes, a carga viral era inferior a 2500 UI/ml. Este resultado sugere que o teste em estudo não terá sensibilidade para amostras com carga viral baixa, não devendo ser utilizado na fase final do tratamento de doentes infetados pelo VHC. Park *et al.* (53) também obteve resultados discrepantes em 4 amostras num total de 161 amostras estudadas, tendo todas elas cargas virais baixas: 73, 82, 261 e 814 UI/ml respetivamente.

Tendo em conta que, não foram observados resultados falsos positivos, ou seja, que todas as amostras positivas com o teste HCV Ag *core* também o foram na técnica de referência, que de um modo geral a carga viral das amostras estudadas foi elevada (73,1% com valor acima de 50000 UI/ml) e que a correlação dos dois métodos foi elevada, o teste será sensível e linear para cargas virais acima de 2500 UI/ml. Assim, neste trabalho foi possível estabelecer uma correlação entre os valores da técnica de referência e do teste em estudo. Verificou-se que, o resultado de carga viral obtido acima de 2500 UI/ml foi 2544 UI/ml, valor a que correspondeu 7,27 fmol/L pelo teste HCV Ag *core* não estando de acordo com o estudo efetuado por Morota *et al.* (22) que descreveu a equivalência de 440 UI/ml a 3



fmol/L, mas em concordância com Park *et al.* (53) onde nesse estudo, 17000 UI/ml equivaleriam a 50 fmol/L.

Como referido por Laperche *et al.* (52), o teste de quantificação do antígeno do core do VHC pode ser utilizado em simultâneo com a pesquisa do anticorpo para o VHC, uma vez que diminui o período de janela (35, 52) sendo também um excelente marcador de replicação viral ativa (41, 53-54, 69). É de fácil implementação na orgânica laboratorial não havendo necessidade de formação especializada para a sua realização e é também um teste mais acessível monetariamente (15 euros/teste) por comparação com a PCR-RT (50 euros/teste). Assim, em situações de urgência, como por exemplo, em doentes de alto risco (hemodialisados) (6, 70), doentes candidatos a transplante hepático e em casos de acidentes de trabalho de profissionais de saúde, quando é necessário obter uma resposta rápida e sobretudo indicadora ou não da existência de replicação viral ativa (28, 52-53, 70), o teste HCV Ag core poderá ser usado em simultâneo com a pesquisa do Anti-HCV.

A influência do genótipo do VHC foi estudada nas amostras discrepantes, de forma a avaliar se essa discrepância seria devido à existência de um determinado genótipo. Verificou-se que, o genótipo 1a estava presente na maioria destas amostras, estando de acordo com a predominância deste genótipo tanto na generalidade das amostras deste estudo como na população Portuguesa e Europeia (15). Os estudos de Ross *et al.* e Ergunay *et al.* (51, 55), Seme *et al.* (41) e Park *et al.* (53), mostraram que, o genótipo não influencia os resultados obtidos pelo teste HCV Ag core.

Como referido neste estudo, a maior parte dos doentes (43,90%) apresentava o genótipo 1a, seguindo-se o 3a (36.60%). Estes resultados estão de acordo com outros estudos realizados, como é exemplo Cornberg *et al.* (15).

Verificou-se que, a maioria dos doentes estudados pertencia ao sexo masculino, estando de acordo com bibliografia científica publicada (71) demonstrando assim que a hepatite C é uma doença que afeta maioritariamente este género (15).

A grande maioria das infeções pelo VHC em doentes que atualmente se encontram na faixa etária dos 40 – 50 anos poderá ter sido contraída antes de 1992 (33, 48), ano em que foram implementados mundialmente os testes de 2ª geração de pesquisa de anticorpos contra o vírus. Neste estudo, verificou-se que a maioria dos doentes se encontrava na faixa etária dos 41 aos 50 anos tal como referido por Ganny *et al.*(33) e Fagundes *et al.* (48), podendo sugerir que, a maioria da população estudada poderá ter contraído a infeção antes desse período, realçando o alto teor de infeção no passado distante como referido por Martins *et al.* (13).

## ***Capítulo V***

Conclusão e perspectivas futuras

## 1. Conclusão e perspectivas futuras

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que, devido à boa correlação dos resultados do teste HCV Ag *core* com a PCR-RT para valores elevados de carga viral, a pesquisa do antígeno do *core* do VHC poderá ser utilizada na monitorização de doentes a fazer tratamento para a infeção por VHC, exceto na fase final deste, quando os valores de carga viral descenderem abaixo de 2500 UI/ml. Este estudo indica ainda que, o uso do teste HCV Ag *core* utilizado em simultâneo com a pesquisa do anticorpo para o VHC em situações de urgência, será uma mais-valia laboratorial, porque permite uma deteção precoce da infeção por VHC. Os dados deste estudo sugerem ainda que, em bancos de sangue em que não são efetuadas quaisquer técnicas de ácidos nucleicos no despiste da infeção por VHC, o teste HCV Ag *core* poderá ser uma boa opção na diminuição do risco de transmissão do vírus, por administração de componentes sanguíneos e seus derivados. No entanto, a existência de testes de 4ª geração de pesquisa simultânea de antígeno e anticorpo fazem com que esta opção possa não ser a mais viável, sobretudo pela questão monetária.

Como perspectiva futura, visto que o teste HCV Ag *core* não revelou coerência na correlação com a PCR-RT em cargas virais baixas, seria importante efetuar um estudo com um maior número de amostras, incluindo de um modo geral, amostras com cargas virais baixas, de modo a avaliar melhor o comportamento do teste perante as mesmas. Poderia ser também interessante estudar a relação qualidade/preço do teste HCV Ag *core* por comparação com os testes de pesquisa simultânea de antígeno e anticorpo do *core* do VHC já existentes no mercado.

## ***Capítulo VI***

Referências bibliográficas

## 1 - Referências Bibliográficas

1. Focaccia R, editor. Tratado de Hepatites Virais: Atheneu; 2007.
2. Houghton M. The Long and Winding Road Leading to the Identification of the Hepatitis C Virus. *Journal of Hepatology*. [Review]. 2009;51:939-48.
3. Hoffman B, Liu Q. Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals. *Journal of The International Association for the Study of the Liver*. 2011.
4. Debasis D, Hong J, Chen S, Wang G, Beigelman L, Seiwert S, Buckman B. Recent advances in drug discovery of benzothiadiazine and related analog as HCV NS5B polymerase inhibitors. *Journal of Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2011;19:4690-703.
5. Icardi G, Ansaldi F, Bruzzone B, Durando P, Lee S, Luigi C, Crovari P. Novel Approach To Reduce the Hepatitis C Virus (HCV) Window Period: Clinical Evaluation of a New Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for HCV Core Antigen. *Journal of clinical Microbiology*. 2001;39(9):3110-4.
6. Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H. *HEPATOLOGY - A clinical textbook*: [www.Hepatologytextbook.com](http://www.Hepatologytextbook.com); 2010.
7. Alter H. Discovery of non-A, non-B hepatitis and identification of its etiology. *The American Journal of Medicine*. 1999 27 December 1999;107(6):16-20.
8. Zhang H, Li S, Wang G, Chen K, Song X, Feng X. Detection of Hepatitis C Virus core antigen for early diagnosis of Hepatitis C Virus Infection in plasma donor in China. *World Journal of Gastroenterology*. 2007;13(19):2738-42.
9. Rehman S, Asfaq U, Javed T. Antiviral drugs against hepatitis C virus. *Journal of Genetic Vaccines and Therapy*. 2011;9(11).
10. Maurice R, Corinne G. New Insights Into HCV Replication: Potencial Antiviral Targets. *Topics In Antiviral Medicine; IAS-USA Live Continuing Medical Education Course 2011*. p. 117-20.
11. Laboratory Tools in the Management of Hepatitis C Virus Infection - Their Evolution and Role in Evolving Algorithms [database on the Internet]. *European Infectious Disease*. 2007.

12. Harvey A. Discovery of non-A, non-B hepatitis and identification of its etiology. *The American Journal of Medicine*. 1999 27 December 1999;107(6):16-20.
13. Martins T, Narciso-Schiavon J, Shiavon L. Epidemiology of Hepatitis C Vírus Infection. *Revista Associação Médica Brasileira*. 2011:105-10.
14. Brandão A, Fuchs S, Silva M, Emer L. Diagnóstico da Hepatite C na prática Médica: revisão da literatura. *Public Health*. 2001:161-8.
15. Cornberg M, Razavi H, Alberti A, GBernasconi E, Buti M, Marinho R, Cooper C, Dalgard O, Dillion J, Flisiak R. A systematic review of hepatitis C virus in Europe, Canada and Israel. *Journal of The International Association for the Study of the Liver*. 2011:30-60.
16. Abd Y, Tabll A, El Din N, Hosny A, Moustafa R, El-Shenawy R, Atef K, El-Awady M. Neutralizing activities of caprine antibodies toads conserved regions of the HCV envelop glycoprotein E2. *Virology Journal*. 2011;8:391-403.
17. Ashfaq U, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology Journal*. 2011;8:161-71.
18. Munir S, Saleem S, Idrees M, Tariq A, Butt S, Rauff B, Hussain A, Badar S, Naudhani M, Fatima Z, Ali M, Ali L, Akram M, Aftab M, Khubaib B, Awan Z. Hepatitis C Treatment: current and future perspectives. *Virology Journal*. 2010;7:296-302.
19. Meyer K, Banerjee A, Frey S, Belshe R, Ray R. A Weak Neutralization Antibody Response to Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein Enhances Virus Infection 2011; 6(8).
20. EASL. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*. 2011.
21. Calado R, Rocha M, Parreira R, Piedade J, Venenno T, Esteves A. Hepatitis C Virus Subtypes Circulating Among Intravenous Drug Users in Lisbon, Portugal. *Journal of Medical Virology*. 2011;83:608-15.
22. Morota K, Fujinami R, Kinukawa H, Machida T, Ohno K, Saegusa H, Takeda K. A new sensitive and automated chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of hepatitis C virus core antigen. *Journal of Virology Methods*. 2009;157:8-14.
23. Sharma S. Hepatitis C Virus: Molecular Biology & Current Therapeutic Options. *Indian Journal of Medicine*. 2010;131:17-34.

24. Burlone M, Budkoska A. Hepatitis C Virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *Journal of General Virology*. 2009;90:1055-70.
25. Farquhar M, Harris H, Diskar M, Jones S, Mee C, Nielsen S, Brimacombe C, Molina S, Toms G, Maurel P, Howl J, Herberg F, Ijzendoorn S, Balfe P, McKeating J. Protein Kinase A-Dependent Step(s) in Hepatitis C Virus Entry and Infectivity. *Journal of Virology*. 2008;82(17):8797-811.
26. Huges H, bano N, McArdle S, Livingston S, Deubner H, McMahon B, Townshend-Bulson L, McMahan R, Rosen H, Gretch D. Genetic Diversity of near Genome-Wide hepatitis C Virus sequences during Chronic Infection: Evidence for Protein structural Conservation Over Time 2011; 6(5).
27. Pham T, Coffin C, Michalak T. Occult Hepatitis C Virus infection: what does it mean? *Journal of The International Association for the Study of the Liver*. 2009:502-11.
28. Leary T, Gutierrez R, Muerhoff S, Birkenmeyer L, Desai S, Dawson G. A Chemiluminescent, Magnetic Particle-Based Immunoassay for the Detection of Hepatitis C Virus Core Antigen in Human Serum or Plasma. *Journal of Medical Virology*. 2006;78:1436-40.
29. Awady M, El Abd Y, Shoeb H, TabII A, Hosny A, Shenawy R, Atef K, El Din N, Bahgat M. Circulating viral core and E1 antigen level as supplemental markers for HCV Chronic hepatitis. *Journal of Virology*. 2006;3(67).
30. Sillanpaa M, Melén K, Porkka P, Fagerlund R, Nevalainen K, Lappalainen M, Julkunen I. Hepatitis C Virus Core, NS3, NS4B and NS5A are The Major Immunogenic Proteins in Humoral Immunity i Chronic HCV Infection. *Journal of Virology*. 2009;6(84).
31. [www.centrodeemergencia.com](http://www.centrodeemergencia.com). 2005.
32. Sociedade Portuguesa de Gastroenterologia. 2011.
33. Ghany M, Strader D, Thomas D, Seeff L. Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C: An Update. *Journal of Hepatology*. 2009;49(4):1335-274.
34. Fabrizi F, Lunghi G, Aucella F, Mangano S, Barbisoni F, Bisegna S, Vigilante D, Limido A, Martin P. Novel Assay Using Total Hepatitis C Virus (HCV) Core Antigen quantification for Diagnosis of HCV Infection in Dialysis Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(1):414-20.



35. Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucort S, Larderie P, Blatt L, Hezode C, Picchio G, Dhumeaux D, Neumann A, McHutchison J, Pawlotsky J. Clinical Utility of Total HCV Core Antigen Quantification: A New Indirect Marker of HCV Replication. *Hepathology*. 2002;36:211-8.
36. Khaliq S, Jahan S, Hassan S. Hepatitis C virus p7: molecular function and importance in hepatitis C virus life cycle and potencial antiviral target. *Journal of The International Association for the Study of the Liver*. 2010;31(5):606-17.
37. Rowan A, Fletcher J, Ryan E, Moran B, Hegarty J, O'Farrelly C, H. K, Mills G. Hepatitis C Virus. Specific Th17 Cells Are Suppressed by Virus-Induced TGF- $\beta$ . *Journal Of Immunology*. 2008;181:4485-94.
38. Ross R, Viazov S, Hilgard P, Gerken G, Roggendorf M. Sensitive Detection of Hepatitis C Virus (HCV) Core Antigen: A Challenge For The Current Paradigm of HCV Diagnostics. Essen - Germany: Departement of Gastroenterology and Hepathology, Essen University Hospital.
39. Lemm J, O'Boyle II D, Liu M, Nower P, Colonna R, Deshpande M, Snyder L, Martin S, Laurent D, Serrano-Wu M, Romine J, Meanwell N, Gao M. Identification of Hepatitis C virus NS5A Inhibitors. *Journal of Virology*. 2010;84(1):482-91.
40. Adair R, Patel A, Corless L, Griffin S, Rowlands D, McCormick C. Expression of hepatitis C virus (HCV) structural proteins *in trans* facilitates encapsidation and transmission of HCV subgenomic RNA. *Journal of General Virology*. 2009;90:833-42.
41. Seme K, Poljak M, Babic T, Mocilnik T, Vince A. The role of core antigen detection in management of Hepatitis C: a critica review. *Journal of Clinical Virology*. 2005;32(2):92-101.
42. Griffin S, Beales L, Clarke D, Worsfold O, Evans S, Jaeger J, Harris M, D. R. The p7 protein of Hepatitis C Virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *Journal for rapid publications of short reports in molecular biosciences*. 2003.
43. [www.AASLD.com](http://www.AASLD.com). Prattice Guidelines for the Diagnosis, Management and Treatment of Hepatitis C 2009.
44. Czepiel J, Biesiada G, Mach T. *Viral Hepatitis C*. 2008:734-9.
45. Chevaliez S, Asselah T. Mechanisms of non-response to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Journal of Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2011;35:31-41.

46. Ron L, Perelson A. Treatment of hepatitis C virus infection with interferon and small molecule direct antivirals: viral kinetics and modeling. *Crit Rev Immunology*. 2010;30(2):131-48.
47. Deuffic-Burban S, Abiteboul D, Lot F, Branger M, Bouvvr E, Yazdanpanah Y. Costs and cost-effectiveness of a different follow-up schedules for dectetion of occupational hepatitis C virus infection. *Journal of Gastroenterology and Hepathology*. 2009;58:105-10.
48. Fagundes G, Bonazza V, Ceretta L, Back A, ettiol J. Detection of the Hepatitis C Virus in a population of adults. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. 2008:396-400.
49. Cuthbert J. Heptitis C: Progress and Problems. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994;7(4):505-32.
50. Marcellin P, Laurenceau T. Cent Question Sur L'Hépatite C. Frison-Roche É, editor. Paris2003.
51. Ergunay K, Sener B, Alp A, Karakaya J, Hasçelik G. Utility of a commercial quantitative hepatitis C virus core antigen assay in a diagnostic laboratory setting. *Journal of Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011;70:486-91.
52. Laperche S, Marrec N, Girault A, Bouchardeau F, Servant-Delmas A, Maniez-Montreunil M, Gallian P, Levayer T, Morel P, Simon N. Simultaneous Detection of Hepatitis C Virus (HCV) Core Antigen and Anti-HCV Antibodies Improves the Early Detection of HCV Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(8):3877-83.
53. Park Y, Lee J, Kim B, Kim D, Han K, Kim H. A New Automated Hepatitis C Virus (HCV) Core Antigen Assay as an Alternative to Real-Time PCR for HCV RNA Quantification  
*Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48:2253-6.
54. Dawson G. HCV Core Antigen and Combination (Antigen/Antibody) Assays for the Detection of Early Seroconversion. *Journal of Medical Virology* 2007;79:54-8.
55. Ross R, Viazov S, Salloum P, Hilgard P, Gerken G, Roggendorf M. Analytical Performance Charateristics and Clinical Utility of a Novel Assay for total Hepatitis C Virus Core Antigen Quantification. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(4):1161-8.

56. Idrees M, Riazuddin C. A Study of Best Positive Predictors for Sustained Virologic Response to Interferon Alpha Plus Ribavirin Therapy in Naive Chronic Hepatitis C Patients 2009; 9.
57. Gaudy C, Thevenas C, Tichet J, Mariotte N, Goudeau A, Dubois F. Usefulness of the Hepatitis C Virus Core Antigen Assay for Screening of a Population Undergoing Routine Medical Checkup. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(4):1722-6.
58. Shen T, Chen X, Zhang W, Xi Y, Cao G, Zhi Y, Wang S, Xu C, Wei L, Lu F, Zhuang H. A Higher Correlation of HCV Core Antigen with CD4+ T Cell Counts Compared with HCV RNA in HCV/HIV-1 Coinfected Patients 2011; 6(8).
59. [www.medical.siemens.com](http://www.medical.siemens.com).
60. Takahashi M, Saito H, Higashimoto M, Atsukawa K, Ishii H. Benefit of Hepatitis C Virus Core Antigen Assay in Prediction of Therapeutic Response to Interferon and Ribavirin Combination Therapy. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(1):186-91.
61. Velosa J. Boceprevir e Telaprevir: na rota da cura da Hepatite C. *Jornal Português de Gastroenterologia*. 2011;18:186-90.
62. Almasio P, Ingrassia D, Vergara B, Filosto S. New therapeutic prospects in HCV treatment. 2008.
63. New hepatitis C antiviral drugs [database on the Internet]. [www.virology.ws](http://www.virology.ws). 2009.
64. Miedouge M, Saune K, Kamar S, Rieu M, Rostaing L, Izopet J. Analytical evaluation of HCV core antigen and interest for HCV screening in haemodialysis patients. *Journal of Clinical Virology*. 2010;48(1):18-21.
65. Seme K, Poljak M, Babic T, Mocilnik T, Vince A. The role of core antigen detection in management of Hepatitis C: a critical review. *Journal of Clinical Virology*. 2004;32(2):92-101.
66. [www.abbottdiagnostics.com](http://www.abbottdiagnostics.com). Getting to the Core of HCV. 2009.
67. Mederacke I, Wedemeyer H, Ciesek S, Steinmann E, Raupach R, Wursthorn K, Manns M, Tillmann H. Performance and Clinical Utility of a Novel Fully Automated quantitative HCV-Core Antigen Assay. *Journal of Clinical Virology*. 2009;46:210-5.
68. Song D, Kang J, Kim S, Hwang S, Kim H, Lee E, Son H. Evaluation of Architect HCV Core Antigen Assay. *Journal of Laboratory Medicine*. 2010;30:654-9.
69. Dawson J. HCV core Antigen Detection in Seropositive Samples

Journal of Medical Virology. 2007;79:52-3.

70. Leão J, Pace F, Chebli J. Infecção pelo Vírus da Hepatite C em Pacientes em Hemodiálise: prevalência e fatores de risco 2010; 47(1).

71. Muhlberger N, Schwarzer R, Lettmeier B, Scrczynski G, S. Z, Siebert U. HCV-Related Burden of Disease in Europe: a Systematic Assessment of Incidence, Prevalence, Morbidity and Mortality. BMC Public Health. 2009.

Texto redigido segundo o novo acordo ortográfico